

**Charakterisierung der molekularen Mechanismen
des Adipokins Adiponectin bei der
Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH)**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für Biologie und
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Josef Wanninger aus Donaustauf
im Jahr 2011

Promotionsgesuch wurde eingereicht am 02.02.2011.

Die Arbeit wurde angeleitet von PD. Dr. Christa Büchler.

Josef Wanninger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Metabolische Syndrom und die Fettleber	1
1.2	Pathogenese der Nicht-alkoholischen Fettleber Krankheit (NAFLD)	3
1.3	Hepatische Funktion von Vertretern der TGF- β Superfamilie	5
1.3.1	Activin A und Follistatin	5
1.3.2	Signaltransduktion von TGF- β und Rolle bei der NAFLD	6
1.3.3	Connective tissue growth factor (CTGF)	7
1.4	Die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)	9
1.5	Das Adipokin Adiponectin	10
1.5.1	Adiponectinstruktur	10
1.5.2	Adiponectinisoformen	10
1.5.3	Struktur und Expression der Adiponectinrezeptoren	11
1.5.4	Rolle von Adiponectin bei der NAFLD	12
1.6	Chemerin	14
1.6.1	Proteolytische Prozessierung von Chemerin	14
1.6.2	Die Chemerinrezeptoren	14
1.6.3	Mögliche Funktion von Chemerin bei der NAFLD	15
1.7	Therapiemöglichkeiten bei NAFLD	16
1.8	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Puffer und Lösungen	22
2.1.4.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA	22
2.1.4.2	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	22
2.1.4.2.1	Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten	22
2.1.4.2.2	Lösungen für SDS-PAGE	23
2.1.4.2.3	Lösungen für Western-Blotting	24
2.1.4.2.4	Lösungen für Activin A- und Chemerin Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)	25
2.1.4.2.5	Lösungen für TGF- β 1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)	25

2.1.4.2.6	Lösungen für die Präparation von Kernextrakten	27
2.1.4.2.7	Lösungen für die Gelatine Zymographie	28
2.1.5	Kulturbedien	28
2.1.5.1	Medien für humane Zellen	28
2.1.5.2	Zellkulturflaschen für humane Zellen	28
2.1.5.3	Medien für <i>E.coli</i>	29
2.1.6	Enzyme, Antikörper und Proteine	29
2.1.6.1	Enzyme	29
2.1.6.2	Primäre Antikörper	29
2.1.6.3	Sekundäre Antikörper	30
2.1.6.4	Proteine und Peptide	30
2.1.7	Kit-Systeme	30
2.1.8	Organismen	31
2.1.8.1	Humane Zellen	31
2.1.8.2	Bakterien	31
2.1.9	Humanes Probenmaterial	32
2.1.9.1	Humane Lebergewebsproben	32
2.1.9.2	Humane Serumproben	33
2.1.10	Murines Probenmaterial	34
2.1.10.1	Mäuse auf Paigen Diät	34
2.1.10.2	Mäuse auf Methionin und Cholin defizienter (MCD) Diät	34
2.1.11	Transfektionsreagenzien	35
2.1.12	siRNAs	35
2.1.13	Oligonukleotide	36
2.1.13.1	Primer für LightCycler-Analysen	36
2.1.13.2	Primer für konventionelle PCR	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Kultivierung von Zellen	38
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	38
2.2.1.2	Kultivierung humaner Zelllinien	38
2.2.1.3	Kultivierung primärer humaner Hepatozyten	39
2.2.1.4	Bestimmung der Nekroserate in primären humanen Hepatozyten	39
2.2.1.5	Kultivierung primärer humaner hepatischer Sternzellen	39
2.2.2	Arbeiten mit DNA	40

2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	40
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.2.2.3	Transformation von <i>E.coli</i>	40
2.2.2.4	Inkubation mit Restriktionsenzymen	41
2.2.2.5	Agarosegelelektrophorese	41
2.2.2.6	Einbringung von PCR Produkten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO	42
2.2.2.7	Transfektion von HepG2 Zellen mit pcDNA3.1/V5-His-TOPO	42
2.2.2.8	Standard PCR	43
2.2.2.9	Real-Time RT-PCR	43
2.2.3	Arbeiten mit RNA	45
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen	45
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	46
2.2.3.3	Reverse Transkription	46
2.2.3.4	Transfektion primärer humaner Hepatozyten mit siRNA	47
2.2.3.4.1	Transfektion mit Transfektionsreagenz	47
2.2.3.4.2	Transfektion mit Elektroporation	47
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	48
2.2.4.1	Präparation von Proteinextrakten	48
2.2.4.1.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	48
2.2.4.1.2	Präparation von Kernextrakten	48
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.4.4	Western-Blotting	50
2.2.4.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	51
2.2.4.6	Gelatine Zymographie	53
2.2.5	Extraktion von Lipiden	53
2.2.6	Statistische Auswertungen	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Adiponectin und seine Rezeptoren in der hepatischen Steatose	55
3.1.1	Adiponectinmenge im Serum bei NAFLD	55
3.1.1.1	Adiponectin ist im Serum von Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber erniedrigt	56
3.1.1.2	Adiponectin ist im Serum bei Mäusen auf Paigendiät erniedrigt	56
3.1.2	Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in der Leber bei NAFLD	58

3.1.2.1	Die AdipoR1 und AdipoR2 mRNA ist in der Leber von Patienten mit NAFLD und NASH unverändert	58
3.1.2.2	AdipoR2 Protein, nicht jedoch AdipoR1 Protein ist in der Leber von Patienten mit Fettleber reduziert	59
3.1.2.3	Die Adiponectinrezeptoren sind in der Leber von Mäusen auf Paigendiät und Ratten auf Hochfettdiät unverändert	60
3.1.3	Primäre humane Hepatozyten akkumulieren Triglyzeride nach Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure	61
3.1.4	Die Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure führt zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate, hat aber keinen Einfluss auf die Nekroserate der Hepatozyten	62
3.1.5	Einfluss von Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin auf die Expression der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in primären humanen Hepatozyten	63
3.1.5.1	Die Inkubation von Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin hat keinen Einfluss auf die mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2	63
3.1.5.2	Die Inkubation von primären Hepatozyten mit Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge der Adiponectinrezeptoren	64
3.2	Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten und verfetteten Hepatozyten	65
3.2.1	Einfluss von Adiponectin auf Activin A-, Follistatin- und TGF- β - in Hepatozyten	65
3.2.1.1	Adiponectin induziert die Activin A mRNA und reprimiert die Follistatin mRNA in primären humanen Hepatozyten	66
3.2.1.2	Adiponectin erhöht die Activin A zu Follistatin Rate im Überstand von primären humanen Hepatozyten	66
3.2.1.3	Die Activin A zu Follistatin Rate ist im Überstand der hepatozytären Zelllinien HepG2, Hep3B, PLC, HUH7 und NeHepLxHT im Vergleich zu primären Hepatozyten erniedrigt	69
3.2.1.4	Adiponectin hat keinen Einfluss auf die TGF- β Proteinmenge im Überstand von primären humanen Hepatozyten	70
3.2.2	Einfluss von Lipidakkumulation auf die Activin A-, Follistatin- und TGF- β Proteinmenge in Zellkulturüberständen von primären humanen Hepatozyten	71

3.2.2.1	Palmitin- und Ölsäure verhindern den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A ohne die basalen Activin A und Follistatin Spiegel zu verändern	71
3.2.2.2	Palmitin- und Ölsäure induzieren TGF- β im Überstand von primären Hepatozyten	72
3.2.2.3	TGF- β reduziert den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A im Überstand	73
3.2.2.4	Palmitin- und Ölsäure blockieren die durch Adiponectin induzierte Translokation von NF- κ B p65 in den Kern	74
3.2.2.5	Die Blockade von NF- κ B reduziert den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A	75
3.2.2.6	Adiponectin induziert Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) in primären humanen Hepatozyten	76
3.2.2.7	Der hemmende Effekt von Palmitin-und Ölsäure auf die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A kann durch Blockierung der TGF- β Signaltransduktion aufgehoben werden	77
3.2.3	Activin A und Follistatin im Serum von Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber	79
3.3	Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β Wirkung in der Leber	80
3.3.1	BAMBI und CTGF Proteinmenge in der NAFLD	80
3.3.1.1	CTGF Protein ist in der Fettleber unverändert, während BAMBI reduziert ist	80
3.3.1.2	Die BAMBI Proteinmenge zeigt eine negative Korrelation mit dem BMI	81
3.3.1.3	Das BAMBI Protein ist in der Leber von Mäusen, die mit Paigendiät oder MCD-Diät gefüttert wurden reduziert	82
3.3.2	Expression von BAMBI in Leberzellen	83
3.3.2.1	Primäre humane Hepatozyten und primäre humane hepatische Sternzellen erzeugen unterschiedliche BAMBI-Isoformen	83
3.3.2.2	Die BAMBI Proteinmenge ist in den hepatozytären Zelllinien HepG2 und Hep3B im Vergleich zu primären Hepatozyten stark reduziert	84
3.3.3	Die Überexpression von BAMBI in HepG2 reduziert den induktiven Effekt von TGF- β auf die Produktion von CTGF	85
3.3.4	Einfluss von Adiponectin auf die Expression von BAMBI und CTGF in primären humanen Hepatozyten und primären humanen hepatischen Sternzellen	86

3.3.4.1	Adiponectin induziert die BAMBI mRNA und das Protein in primären Hepatozyten	86
3.3.4.2	Adiponectin induziert BAMBI Protein in hepatischen Sternzellen	87
3.3.4.3	Die AMPK und NF- κ B sind an der Induktion von BAMBI durch Adiponectin in Hepatozyten beteiligt	88
3.3.4.4	Adiponectin reduziert die CTGF mRNA und das Protein in primären humanen Hepatozyten	89
3.3.4.5	PPAR- α ist entscheidend an der Reduktion von CTGF durch Adiponectin in Hepatozyten beteiligt	90
3.3.5	Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3 in primären humanen Hepatozyten	91
3.3.5.1	Adiponectin inhibiert die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3	91
3.3.5.2	Der PPAR- α Agonist WY14643 inhibiert die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3	93
3.3.6	Einfluss von Adiponectin auf die Aktivität von MMP-9	94
3.3.6.1	Die MMP-9 Aktivität ist in der Fettleber unverändert, aber in der fibrotischen Leber erhöht	94
3.3.6.2	Adiponectin erhöht die MMP-9 mRNA und Aktivität in primären humanen Hepatozyten	94
3.4	Einfluss von Adiponectin auf Chemerin und CMKLR1 in der Leber	96
3.4.1	Chemerin Protein ist in der Fettleber unverändert, während CMKLR1 reduziert ist	96
3.4.2	Die Proteinmenge von Chemerin ist in primären Hepatozyten höher als in Adipozyten und hepatischen Sternzellen, CMKLR1 wird in der Leber von KC, HSC und Hepatozyten produziert	97
3.4.3	Einfluss von freien Fettsäuren, sowie Adipokinen und Zytokinen auf Chemerin und CMKLR1 in primären humanen Hepatozyten	100
3.4.3.1	Palmitin- und Ölsäure haben keinen Einfluss auf CMKLR1 und auf Chemerin im Zelllysatsat und Überstand	100
3.4.3.2	Adiponectin hat keinen Einfluss auf Chemerin im Zelllysatsat, induziert aber CMKLR1 auf mRNA und Proteinebene	101
3.4.3.3	Adiponectin, IL-6, Leptin und TGF- β regulieren Chemerin im Überstand	102

3.4.3.4	Chemerin ist in der Leber von Adiponectin KO Mäusen erhöht, während CMKLR1 reduziert ist	103
3.4.4	Einfluss von Chemerin auf die Insulinwirkung in primären humanen Hepatozyten	104
3.4.4.1	Die Inkubation von Hepatozyten mit rekombinantem Chemerin reduziert die Insulin vermittelte Phosphorylierung von Akt und erhöht die Glukosemenge im Überstand dieser Zellen	104
3.4.4.2	Chemerin Knock down hat keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt, senkt jedoch die Synthese von CTGF	106
3.4.5	Chemerin ist im Serum von Patienten mit Fettleber reduziert	107
4	Diskussion	108
4.1	Adiponectin und seine Rezeptoren in der hepatischen Steatose	108
4.1.1	Adiponectinserumkonzentrationen in der NAFLD	108
4.1.2	Die Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in der hepatischen Steatose	109
4.2	Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten und verfetteten Hepatozyten	111
4.2.1	Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten Hepatozyten	111
4.2.2	Activin A ist im Überstand von hepatozytären Zelllinien geringer und Follistatin höher als im Überstand von primären humanen Hepatozyten	112
4.2.3	Einfluss von Adiponectin auf Activin A in verfetteten Hepatozyten	112
4.2.4	Zellulärer Mechanismus der Inhibierung der Adiponectinwirkung auf Activin A in verfetteten Hepatozyten	113
4.2.5	Die Activin A und Follistatin Serumkonzentrationen sind in Patienten mit Fettleber unverändert	114
4.3	Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β Wirkung in der Leber	115
4.3.1	Der TGF- β Pseudorezeptor BAMBI ist in der Fettleber reduziert während CTGF nicht verändert ist	115
4.3.2	Hepatozyten und hepatische Sternzellen synthetisieren unterschiedliche Isoformen von BAMBI Protein	116
4.3.3	BAMBI inhibiert die TGF- β Wirkung in Hepatozyten	116
4.3.4	Adiponectin induziert BAMBI und reprimiert CTGF	117

4.3.5	Adiponectin wirkt der TGF- β induzierten SMAD2 und SMAD3 Phosphorylierung entgegen	117
4.3.6	Adiponectin erhöht die MMP-9 Aktivität im Überstand von primären humanen Hepatozyten	118
4.4	Einfluss von Adiponectin auf Chemerin und CMKLR1 in der Leber	119
4.4.1	CMKLR1 jedoch nicht Chemerin ist in der humanen Fettleber vermindert	119
4.4.2	Chemerin wird in der Leber hauptsächlich von den Hepatozyten synthetisiert	119
4.4.3	Chemerin wird in primären humanen Hepatozyten durch Adiponectin, Leptin und TGF- β reguliert	120
4.4.4	Chemerin reduziert die Insulinwirkung in primären humanen Hepatozyten	120
4.4.5	Chemerin ist im Serum von Fettleberpatienten nicht verändert	121
5	Zusammenfassung	122
6	Publikationen	123
7	Literaturverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl Coenzym A Carboxylase
Acrp30	Adiponectin
AdipoR1	Adiponectinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponectinrezeptor 2
AdipoQ	Adiponectin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
AMV-RT	Avian Myoblastosis Virus Reverse Transkriptase
apM-1	Adiponectin
Apo B	Apolipoprotein B
Apo E	Apolipoprotein E
APPL1	adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosin-binding domain and a leucin zipper motif
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
ChREBP	Carbohydrat Responsive Element Binding Protein
Cp	Crossing Point
CXCL8	Interleukin 8
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FFS	freien Fettsäuren
GBP28	Adiponectin
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
Hek293	Human Embryonic Kidney 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxymethylglutaryl Coenzym A Reduktase

HMW	High Molecular Weight
HMW-APM	High Molecular Weight Adiponectin
HNF4- α	Hepatocyte Nuclear Faktor 4 alpha
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
HSC	Hepatischen Sternzelle
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
Inh	Inhibitor
IRS	Insulin Rezeptorsubstrat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight
LMW-APM	Low Molecular Weight Adiponectin
LPS	Lipopolysaccharid
Metf.	Metformin
min	Minuten
MMW	Medium Molecular Weight
mRNA	messenger RNA
NAFLD	Nicht Alkoholische Fettleber Krankheit
NASH	Nicht Alkoholische Steatohepatitis
neg.	negativ
NF- κ B	Nuklear Factor Kappa B
LPC	Lysophosphatidylcholin
OCT1	Organic Cation Transporter 1
p38 MAP-Kinase	p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PBST	PBS mit Tween®20
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
pHep	primäre Hepatozyten
polydIdC	poly Desoxyinosin Desoxycytosin
PPAR- α	Peroxisome Proliverator-Activated receptor alpha
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PS	Phosphatidylserin
P-STAT3	Phospho STAT3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure

siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SP	Signalpeptid
SPM	Sphingomyelin
SREBP1c	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Bor-EDTA
TEMED	N, N, N', N' , - Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyzeride
TGF- β 1	Transforming Growth Factor beta 1
TNF- α	Tumor Necrosis Faktor alpha
TNF-Familie	Tumor Necrosis Faktor -Familie
Tris-NH ₃	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAT	viszerales Fettgewebe
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHR	Waist to hip ratio
WT	Wildtyp
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom und die Fettleber

Das Metabolische Syndrom ist definiert durch viszerale Fettleibigkeit (Bauchumfang bei Frauen mehr als 80 cm und bei Männern mehr als 94 cm) und mindestens zwei der vier Faktoren Bluthochdruck, erhöhte Fastenglukose, erhöhter Serum Triglyzeridspiegel und niedriges High Density Lipoprotein (HDL) [1]. Durch zahlreiche Patientenstudien konnte gezeigt werden, dass erhöhtes viszerales Fettgewebe (VAT) in einem engeren Zusammenhang mit Insulinresistenz und Leberschädigung steht als die Erhöhung des Body Mass Index (BMI). Viszerales und subkutanes Fettgewebe scheinen sich bezüglich ihrer Sekretionsprodukte und ihrer metabolischen Funktion voneinander zu unterscheiden. Der hohe Lipidumsatz im viszeralen Fettgewebe führt zu einem erhöhten Fluss von freien Fettsäuren (FFS) über die Pfortader zur Leber. Dort werden sie als Triglyzeride im Zytoplasma gespeichert [2] (Abbildung 1).

Insulin fördert die Aufnahme von Glukose in Hepatozyten und inhibiert die hepatische Glukoneogenese. Verfettete Hepatozyten sind insulinresistent, wodurch sich der Plasmaglukosespiegel erhöht [1]. Pankreatische β -Zellen sezernieren daraufhin mehr Insulin, was zusammen mit dem verminderten Insulinabbau durch die Fettleber zu einer Hyperinsulinämie führt. Trotz der hepatischen Insulinresistenz aktiviert Insulin den Transkriptionsfaktor Sterolregulationselementbindeprotein 1c (SREBP-1c) und der hohe Blutglukosespiegel den Transkriptionsfaktor Carbohydrat Responsive Element Binding Protein (ChREBP), wodurch die Synthese von freien Fettsäuren in der Leber induziert und die β -Oxidation reprimiert wird. In der Fettleber ist auch der inhibitorische Effekt von Insulin auf die hepatische Very Low Density Lipoprotein Produktion (VLDL) verringert, was zusammen mit einem erhöhten Angebot an Triglyzeriden zu einer gesteigerten VLDL Sekretion führt. Dadurch sinkt das HDL zu LDL Verhältnis im Blut wodurch sich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht [2] (Abbildung 1).

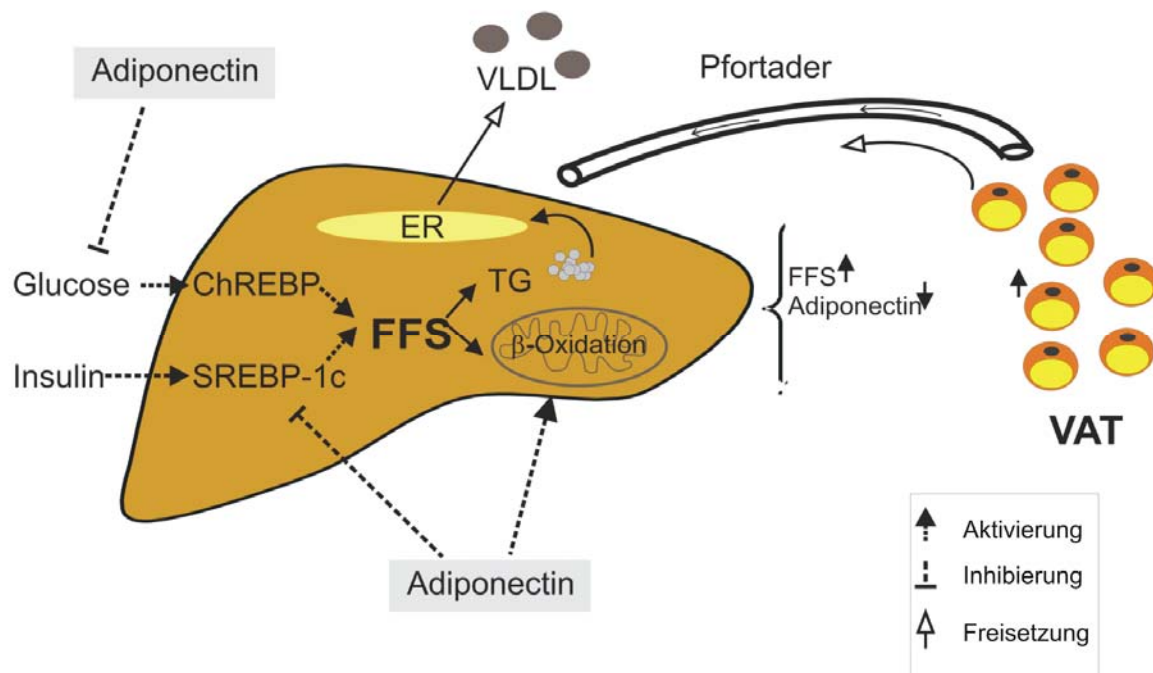


Abbildung 1: Viszerale Fettgewebe und Fettleber [2]

Bei zunehmender viszeraler Fettleibigkeit gelangen mehr freie Fettsäuren (FFS) und weniger Adiponectin über die Pfortader zur Leber. Adiponectin senkt die endogene Glukoseproduktion in der Leber. Außerdem reprimiert Adiponectin den Transkriptionsfaktor Sterol Regulationselement Bindeprotein 1c (SREBP-1c) und fördert die β -Oxidation. Dadurch sinkt die Menge an FFS in der Leber und es stehen weniger Triglyzeride (TG) zum Einbau in Very Low Density Lipoproteine (VLDL) zur Verfügung.

Neben der Speicherung von Energie in Form von Triglyzeriden sezerniert das Fettgewebe in seiner Rolle als endokrines Organ eine Reihe von physiologisch aktiven Substanzen, wie Visfatin, Tumor Necrosis Faktor (TNF), die Interleukine 6 und 10 (IL-6, IL-10) und Adiponectin, die als Adipokine bezeichnet werden [3].

Ein Adipokin, das bei der Entstehung des metabolischen Syndroms eine entscheidende Rolle spielt ist Leptin. Die Freisetzung von Leptin wird durch Triglyzerideinlagerungen im Fettgewebe reguliert und der Leptinserumspiegel ist bei übergewichtigen Personen erhöht. Leptin unterdrückt den Appetit durch Bindung an den Leptin Rezeptor b (LEPRb) in den Neuronen des Hypothalamus im Stammhirn [4]. Leptin defiziente (ob/ob) Mäuse und Leptin Rezeptor mutierte (db/db) Mäuse fressen viel mehr als Wildtyp Tiere und werden extrem fettleibig [5-6]. Fettleibige Personen entwickeln eine Leptinresistenz und haben dadurch ständig Appetit [4].

1.2 Pathogenese der Nicht-alkoholischen Fettleber Krankheit (NAFLD)

Die Nicht-alkoholische Fettleber Krankheit (NAFLD) wird als solche diagnostiziert, wenn der Leberfettgehalt mindestens 5 bis 10% des Gesamtlebergewichts beträgt und kein exzessiver Alkoholenuss oder andere Leberkrankheiten vorliegen [1]. Unter dem Begriff NAFLD fasst man die Nicht-alkoholische Fettleber, die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die Leberfibrose und die Zirrhose, die im Verlauf der NAFLD in der Regel chronologisch auftreten, zusammen. Etwa 20 bis 30% der Gesamtbevölkerung haben eine Fettleber. Die Fettleber stellt für den Patienten keine Komplikation dar und wird in der Regel nicht behandelt. Bei circa 10 bis 25% dieser Personen (etwa 2 bis 3% der Gesamtbevölkerung) kann sich jedoch aus der Fettleber eine NASH entwickeln, ein Zustand bei dem zusätzlich zur Verfettung eine chronische Entzündung in der Leber vorliegt. Im weiteren Verlauf der NASH kommt es dann zu einer Leberfibrose und schließlich zu einer Zirrhose, die für den Patienten, sofern er nicht transplantiert wird, tödlich endet [7]. Welche Faktoren entscheidend dafür sind, dass manche Personen eine NASH entwickeln, während andere im Zustand einer harmlosen Fettleber verbleiben ist bisher nicht geklärt.

Bei Fettleberpatienten zeigt sich ein erhöhter Serum Lipopolysaccharid (LPS) –Spiegel, der durch eine erhöhte Darmdurchlässigkeit für Mikroorganismen und durch eine gestörte hepatische Reinigung von LPS zustande kommt. LPS bindet an den Toll like Rezeptor 4 (TLR4) auf Kupffer Zellen (KC), woraufhin diese vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren. Außerdem setzen KC als Antwort auf die Adipokine Leptin und Visfatin, die bei Fettleibigkeit vermehrt von Adipozyten freigesetzt werden, proinflammatorische Zytokine frei. Dies hat zur Folge, dass Leukozyten angelockt werden und in die Leber einwandern. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Anzahl der KC selbst positiv mit dem Grad der NAFLD korreliert [8].

Man nimmt heute an, dass auch die Art der Fettsäuren, die gespeichert werden eine Rolle für den Krankheitsverlauf der NAFLD spielt. In der Fettleber werden im Vergleich zur nicht verfetteten Leber mehr gesättigte Fettsäuren in Triglyzeride eingebaut. Außerdem nimmt der Gehalt an Diacylglyceriden zu, von denen gezeigt werden konnte, dass sie den Insulinsignalweg inhibieren. Es wird mehr Ceramid eingelagert, welches die Entzündung und den Zelltod fördert [1]. Die hohe Menge an freien Fettsäuren in der Fettleber führt außerdem in Hepatozyten zu einer Induktion der mikrosomalen Enzyme Cyp4A1 und Cyp2E1 und aktiviert die mitochondriale β -Oxidation. Dies hat zur Folge, dass mehr ROS gebildet werden, die zwar von Vitamin E und Glutathion abgebaut werden können, wenn sie aber im Übermaß

vorhanden sind mit Lipiden reagieren können. Bestimmte Lipidperoxidaionsprodukte führen dann zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TGF- β , CXCL8 und TNF [9]. ROS schädigen auch die DNA, was sich vor allem bei mitochondrialer DNA auswirkt, da diese keine protektiven Histone hat und im Mitochondrieninnenraum wenig Reperaturenzyme vorhanden sind [10]. Außerdem können ROS Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) aktivieren und den Apoptose-induzierenden Oberflächenrezeptor CD95 erhöhen, wodurch die Hepatozyten vermehrt in Apoptose übergehen [4].

Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus einwandernden Leukozyten, aktivierten Kupffer Zellen und apoptotischen Hepatozyten, sowie die erhöhte Belastung mit ROS führen zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSC), die daraufhin zu Myofibroblasten differenzieren und als solche exzessiv extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren. Eine Leberfibrose ist gekennzeichnet durch eine zehnfache Erhöhung der ECM und diese ist vor allem der Syntheseaktivität dieser Zellen zuzuschreiben [11].

Man geht heute davon aus, dass nicht nur Sternzellen zu Fibroblasten differenzieren, sondern auch Hepatozyten ihren epithelialen Phänotyp im Verlauf der NASH verlieren können und zu Fibrozyten mit einem mesenchymalen Phänotyp differenzieren. Dieser Prozess, der als epitheliale, mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird, führt zu einer veränderten Leberarchitektur und einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten [11].

Patienten mit NASH haben zudem ein erhöhtes Herzinfarktrisiko [1] und entwickeln vermehrt ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) [12].

1.3 Hepatische Funktion von Vertretern der TGF- β Superfamilie

Die Liganden der TGF- β Superfamilie interagieren mit einer konservierten Familie von Serin/Threonin spezifischen Proteinkinase Rezeptoren und generieren intrazelluläre Signale über eine konservierte Familie von Proteinen, die SMADs genannt werden [13]. Zu den Mitgliedern dieser Superfamilie gehören die Activine und TGF- β , die im Verlauf der NAFLD besonders bei der Fibrogenese eine entscheidende Rolle spielen [14].

1.3.1 Activin A und Follistatin

Activin A, ein Homodimer aus zwei Activin β A Untereinheiten, entfaltet seine zelluläre Wirkung über Aktivierung der Ser/Thr Kinase gekoppelten Rezeptoren ActivinR I und ActivinR II, die bei Bindung von Activin A an den Rezeptor II ein Heterodimer bilden und dann die intrazellulären Signalmoleküle SMAD2 und SMAD3 rekrutieren und phosphorylieren. Diese bilden als Trimer mit SMAD4 einen aktiven Transkriptionsfaktor.

Activin A ist ein Inhibitor der DNA-Synthese und induziert Apoptose in Hepatozyten [15]. Follistatin bindet irreversibel an Activin A und hebt dadurch dessen Wirkung auf. In CCl₄-behandelten Ratten findet sich Activin A gehäuft im fibrotischen Gewebe der Leber und stimuliert in HSC die Bildung von extrazellulären Matrixproteinen [16]. Die Verabreichung von rekombinantem Follistatin [17] oder die Überexpression von Follistatin in der Leber unterdrückt die Bildung von extrazellulärer Matrix durch HSC und die Apoptose von Hepatozyten in diesem Modell [15]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Activin A an der spontanen Induktion des profibrogenen Proteins Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in Rattenhepatozyten in-vitro beteiligt ist. Die Tatsache, dass die CTGF Induktion durch Activin β A siRNA, nicht jedoch durch extrazelluläre Activin A Inhibitoren wie Follistatin unterdrückt werden konnte zeigt, dass auch ein intrazellulärer Signalmechanismus von Activin A existiert, der ebenfalls zur Aktivierung von SMAD2 und 3 führt [16].

Eine Studie ergab, dass die Activin A zu Follistatin Rate im Serum bei NASH Patienten im Vergleich zu Patienten mit einfacher Fettleber erhöht ist. Verantwortlich dafür ist eine erhöhte Activin A Serummenge in der NASH, die bei diesen Patienten auch positiv mit dem Grad der Fibrose assoziiert ist. In der humanen hepatischen Karzinomzelllinie HUH7 reprimiert Activin A in-vitro die bei der Lipogenese aktiven Enzyme Fettsäuresynthase (FAS) und Carnityl Palmitoyltransferase I (CPT-1). Außerdem hat die Stimulation mit Activin A zur

Folge, dass weniger gesättigte und dafür mehr ungesättigte Fettsäuren in diesen Zellen in Triglyzeride eingebaut werden [18].

1.3.2 Signaltransduktion von TGF- β und Rolle bei der NAFLD

TGF- β bindet an Heterodimere der Ser/Thr Kinase Rezeptoren TGFR I und II, die dann SMAD2 und 3 aktivieren und als Komplex mit SMAD4 in den Kern wandern (Abbildung 2). Durch die transkriptionelle Aktivierung von SMAD7 durch TGF- β , dass an den TGFR I bindet werden die TGF- β Signale im Sinne einer negativen Rückkopplung abgeschaltet. Unabhängig von diesem Signalweg aktiviert TGF- β auch noch den Transkriptionsfaktor Snail.

TGF- β gilt als einer der wichtigsten Faktoren bei der Induktion und Progression der NASH. In der Leber wird TGF- β vor allem von Kupffer Zellen produziert. Es ist entscheidend für die Aktivierung von hepatischen Sternzellen. So bleiben in Ratten mit Gallengangsligatur die Sternzellen in ruhendem Zustand, wenn man SMAD7 überexprimiert. In Hepatozyten induziert TGF- β die Apoptose. Dieser Effekt kann ebenfalls durch Überexpression von SMAD7 aufgehoben werden [19].

In Hepatozyten fördert TGF- β die EMT. In-vitro reduziert TGF- β die Membranproteine E-Cadherin und Claudin-1, die an der Bildung von Tight junctions beteiligt sind. Außerdem nimmt die Anzahl an Tight junctions ab und die Aktinstruktur der Zelle verändert sich. Diese Veränderungen werden der Aktivierung von Snail durch TGF- β zugeschrieben [20]. Man nimmt an, dass Hepatozyten, die dem proapoptotischen Effekt von TGF- β entgehen, zum Beispiel durch eine hohe Expression von SMAD7, durch die Aktivierung von Snail einen mesenchymalen Phänotyp entwickeln und extrazelluläre Matrix, sowie proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernieren [19].

Das Transmembranprotein BMP activated and membrane bound inhibitor (BAMBI) ahmt den TGFR I nach, besitzt aber keine intrazelluläre Kinasedomäne. Bildet BAMBI ein Dimer mit TGFR II, so findet nach Bindung von TGF- β an diesen Rezeptor keine Signalweiterleitung statt (Abbildung 2). In hepatischen Sternzellen führt LPS über Bindung an TLR4 zu einer Reduktion von BAMBI. Dadurch verstärkt sich die profibrogene Wirkung von TGF- β auf diese Zellen [21].

1.3.3 Connective tissue growth factor (CTGF)

CTGF wird in der Leber von Sternzellen, Epithelzellen und Hepatozyten produziert und freigesetzt. Die Expression von CTGF in diesen Zellen wird durch TGF- β induziert. Zudem verstärkt CTGF die Wirkung von TGF- β , da es an TGF- β binden kann und dessen Bindung an den TGF Rezeptor festigt (Abbildung 2). Zudem kann es auch mit dem TGF- β Antagonisten Bone Morphogenic Protein-7 (BMP-7) interagieren und dessen Bindung an seinen Rezeptor verhindern. CTGF bindet seinerseits an den LDL-Rezeptor Protein/ α 2 Macroglobulin Rezeptor (LRP) und wird daraufhin internalisiert und abgebaut. Dabei konkurriert CTGF mit Wnt um die Bindung an LRP und inhibiert somit den Wnt/ β -Catenin Signalweg. CTGF kann auch mit Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Fibronectin, Proteoglykanen und Kollagenen in Wechselwirkung treten. Dabei wird ihm eine Rolle bei der Akkumulation und Umgestaltung der ECM zugeschrieben, die ein wichtiges Merkmal der Leberfibrose ist. Humane Studien und Tiermodelle haben gezeigt, dass CTGF vor allem in akut fibrosierendem Gewebe stark induziert ist [22].

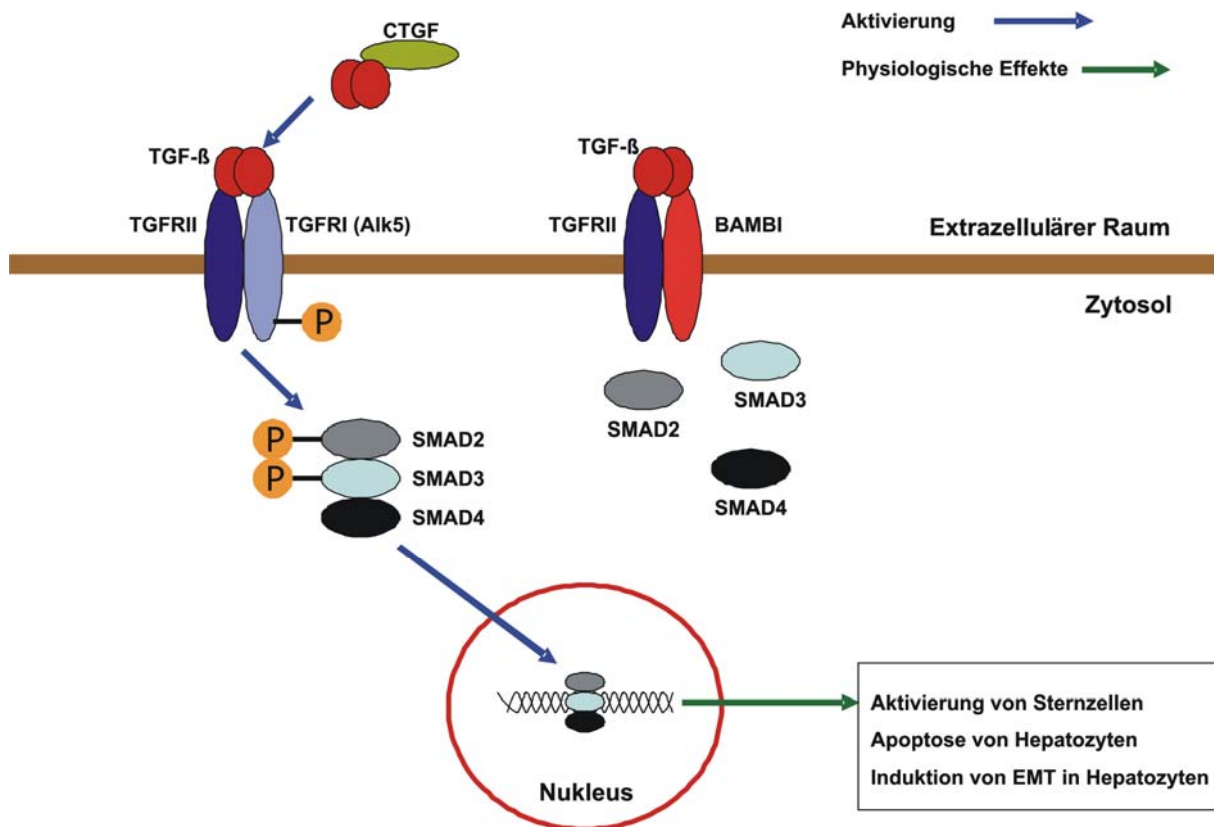


Abbildung 2: Einfluss von CTGF und BAMBI auf die TGF- β Signaltransduktion

Connective Tissue Growth Factor (CTGF) bindet an TGF- β und erhöht dadurch dessen Affinität zum TGF Rezeptor II (TGFR II). Bei Interaktion dieses Komplexes mit dem TGF Rezeptor I (TGFR I) wird eine intrazelluläre Kinasekaskade in Gang gesetzt, die zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 führt. Diese können dann SMAD4 rekrutieren und der Komplex wandert als aktiver Transkriptionsfaktor in den Kern. Der TGFR II kann auch mit dem Transmembranprotein BMP activated and membrane bound inhibitor (BAMBI) in Wechselwirkung treten. BAMBI hat jedoch keine intrazelluläre Kinasedomäne, so dass bei Bindung von TGF- β an den TGFR II keine intrazelluläre Signalweiterleitung stattfindet.

1.4 Die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)

MMP-9 ist eine Gelatinase und kann denaturiertes Kollagen III, IV und V spalten [23]. MMPs sind an der Umgestaltung der ECM beteiligt und spielen in der frühen Phase der Sternzellaktivierung eine Rolle. In der CCl₄ induzierten Leberfibrose in Mäusen und in der durch Gallengangsligatur induzierten Leberfibrose in Ratten wird die Expression von MMPs, darunter auch MMP-9 bereits vor der Aktivierung von hepatischen Sternzellen induziert. Ein in-vitro Versuch, in dem isolierte Sternzellen in einem dreidimensionalen ECM Modell kultiviert wurden zeigte, dass IL-1 die Aktivierung der Zellen und die Freisetzung von MMPs (mit dem größten Effekt auf MMP-9) induziert. Voll aktivierte Sternzellen verlieren ihre Fähigkeit MMPs zu erzeugen. In der fortgeschrittenen Fibrose wirken MMPs fibrolytisch. Die Überexpression von MMP-1 senkt den Gehalt an ECM und fördert die Apoptose von Sternzellen nach Induktion einer Fibrose mit CCl₄ in Mäusen [24].

1.5 Das Adipokin Adiponectin

Die meisten Adipokine zeigen bezüglich ihrer Serumkonzentration eine positive Korrelation mit der Körperfettmasse. Die bisher einzig bekannte Ausnahme neben Omentin bildet Adiponectin, dessen Konzentration im Serum von fettleibigen Personen abnimmt. Die Synthese von Adiponectin wird während der Adipozytenreifung durch Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR- γ) induziert, und es wird von differenzierten Adipozyten konstitutiv sezerniert [25]. Adiponectin zirkuliert im Serum von Menschen, Mäusen und Ratten in sehr hohen Mengen. Mit Konzentrationen von 3 $\mu\text{g/ml}$ bis 30 $\mu\text{g/ml}$ stellt es 0,01% der Gesamtproteinmasse im humanen Serum dar [26].

1.5.1 Adiponectinstruktur

Humanes Adiponectin (Acrp30, apM-1, AdipoQ, GBP28) ist aus 244 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa. Das Protein besteht aus einem Signalpeptid (SP) am Aminoterminal, gefolgt von einer Kollagen-Tripelhelix und einer globulären Domäne am Karboxyterminal. Der globuläre Bereich zeigt eine hohe Homologie zu den Untereinheiten der Komplementfaktoren aus der C1q Familie und den globulären Domänen der Kollagene VIII und X [27-28]. Durch Wechselwirkungen der globulären Domänen untereinander wird die Bildung von Homotrimeren vermittelt, die strukturelle Ähnlichkeiten zur TNF-Familie aufweisen [29] (Abbildung 3).



Abbildung 3: Schematische Darstellung von Adiponectin [27, 30]

Adiponectin ist aufgebaut aus einem aminoterminalen Signalpeptid (SP) gefolgt von einer Kollagen-Domäne und einer karboxyterminalen globulären Domäne.

1.5.2 Adiponectinisoformen

Im humanen Serum kommt Adiponectin als trimere Low Molecular Weight Form (LMW), als hexamere Medium Molecular Weight Form (MMW), die aus zwei Homotrimeren besteht, und als oligomere High Molecular Weight Form (HMW), die aus vier bis sechs Homotrimeren aufgebaut ist, vor [31]. Die Bildung von MMW- und HMW- Adiponectin wird

durch Disulfidbrücken im Bereich der Kollagen-Domäne vermittelt. Hydroxylierungen und Glykosylierungen von Lysinen in der Kollagen-Domäne beeinflussen zusätzlich die Aktivität der höher molekularen Formen von Adiponectin [32-33] (Abbildung 4). Globuläres Adiponectin, dass durch Proteolyse entsteht, wird in sehr geringen Konzentrationen im Serum gefunden [34].

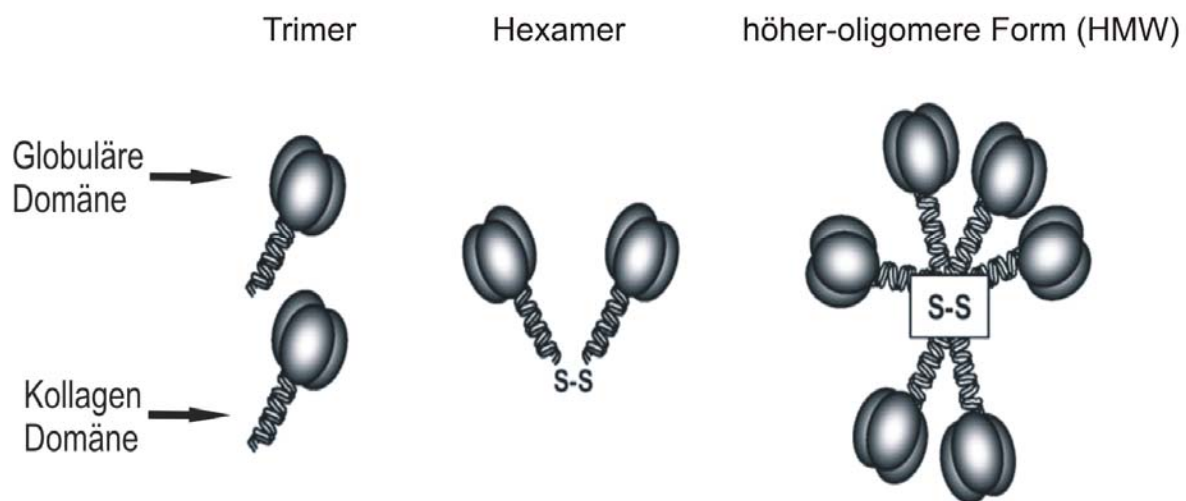


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen multimeren Isoformen des Adiponectin [35]. Über Disulfidbrücken in der Kollagendomäne entstehen höher molekulare Formen von Adiponectin.

Rekombinantes Adiponectin, das in *E. coli* exprimiert wurde, bildet lediglich trimere Formen, die sehr geringen Mengen an HMW-Adiponectin sind nicht richtig gefaltet und daher höchstwahrscheinlich inaktiv [32]. Um diesen Nachteil zu umgehen wurde im Rahmen dieser Arbeit HMW-Adiponectin verwendet, das rekombinant in einer Mauszelllinie synthetisiert worden war, welche die für die korrekte Oligomerisierung notwendigen Hydroxylierungen und Glykosylierungen durchführen kann [36].

1.5.3 Struktur und Expression der Adiponectinrezeptoren

In der Literatur sind drei Adiponectinrezeptoren beschrieben. Die Adiponectinrezeptoren AdipoR1 (42 kDa) und AdipoR2 (43 kDa) zeigen auf Aminosäureebene eine 67%ige Homologie [32, 37]. Beide Proteine gehören zu einer neuen Familie von Rezeptoren mit

sieben Transmembrandomänen, die jedoch keine signifikante Homologie mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder anderen Säugerproteinen aufweisen [32].

Entgegen der ersten Beschreibungen des AdipoR2 als ein 35 kDa großes Protein zeigte sich, dass der offene Leserahmen, der sich aus den Genbanken abgelegten genomischen und cDNA Sequenzen ergab, für ein 43 kDa Protein codiert. Der AdipoR2 wurde in einen Vektor kloniert und sowohl das in-vitro translatierte Protein als auch das in HepG2 und COS-7 Zellen rekombinant exprimierte Protein ergaben, das AdipoR2 eine Größe von 43 kDa hat. Dabei handelt es sich um 75 zusätzliche Aminosäuren am N-terminus [38].

Die beiden Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 kommen in hohem Maße in Hepatozyten und hepatozytären Zelllinien vor [39]. Weitere Analysen zeigten die Expression der beiden Rezeptoren in Muskelzellen, Adipozyten [40], Makrophagen [41], der pankreatischen β -Zelle [42], der hepatischen Sternzelle und in Kupffer Zellen [2].

Neben AdipoR1 und AdipoR2 wurde T-Cadherin als Adiponectinrezeptor, der ausschließlich HMW-Adiponectin bindet, beschrieben. T-Cadherin wird vor allem von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und scheint somit keine direkte Bedeutung für die hepatischen Effekte von Adiponectin zu haben [32].

1.5.4 Rolle von Adiponectin bei der NAFLD

In der Leber konnte gezeigt werden, dass Adiponectin durch Aktivierung der Carnitin-Palmitoyltransferase I [43] und Hemmung der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) die β -Oxidation erhöht. Die Fettsäuresynthese wird durch Adiponectin reprimiert [44] und der Transkriptionsfaktor SREBP-1c inhibiert, wodurch die hepatische Fettsäuresynthese verringert wird. Außerdem reprimiert Adiponectin die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die Glucose-6-Phosphatase, wodurch die endogene Glukoseproduktion in der Leber vermindert wird [45]. Adiponectin unterstützt also einerseits die Wirkung von Insulin durch die Senkung des Plasmaglukosespiegels und trägt durch Verminderung des hepatischen Triglyzeridspiegels zu einer Insulinsensitivierung bei [2].

Adiponectin ist auch bei NASH und Leberfibrose protektiv. In einem Mausmodell der LPS-induzierten akuten Hepatitis wirkte eine Adiponectinvorbehandlung von Kupffer Zellen der LPS-induzierten TNF- α Produktion entgegen und erhöhte die Menge an dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10. Untersuchungen an Adiponectin KO Mäusen zeigten, dass diese erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt waren und dafür wohl der fehlende inhibitorische Effekt von Adiponectin auf Cyp2E1 verantwortlich war. Außerdem wirkt Adiponectin in

HSC der TGF- β induzierten Translokation von SMAD2 in den Kern entgegen, wodurch deren Aktivierung und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen unterdrückt aus diesen wird. Adiponectin inhibiert auch in aktivierten Sternzellen die Migration und Proliferation und fördert die Apoptose dieser Zellen [46] (Abbildung 5).

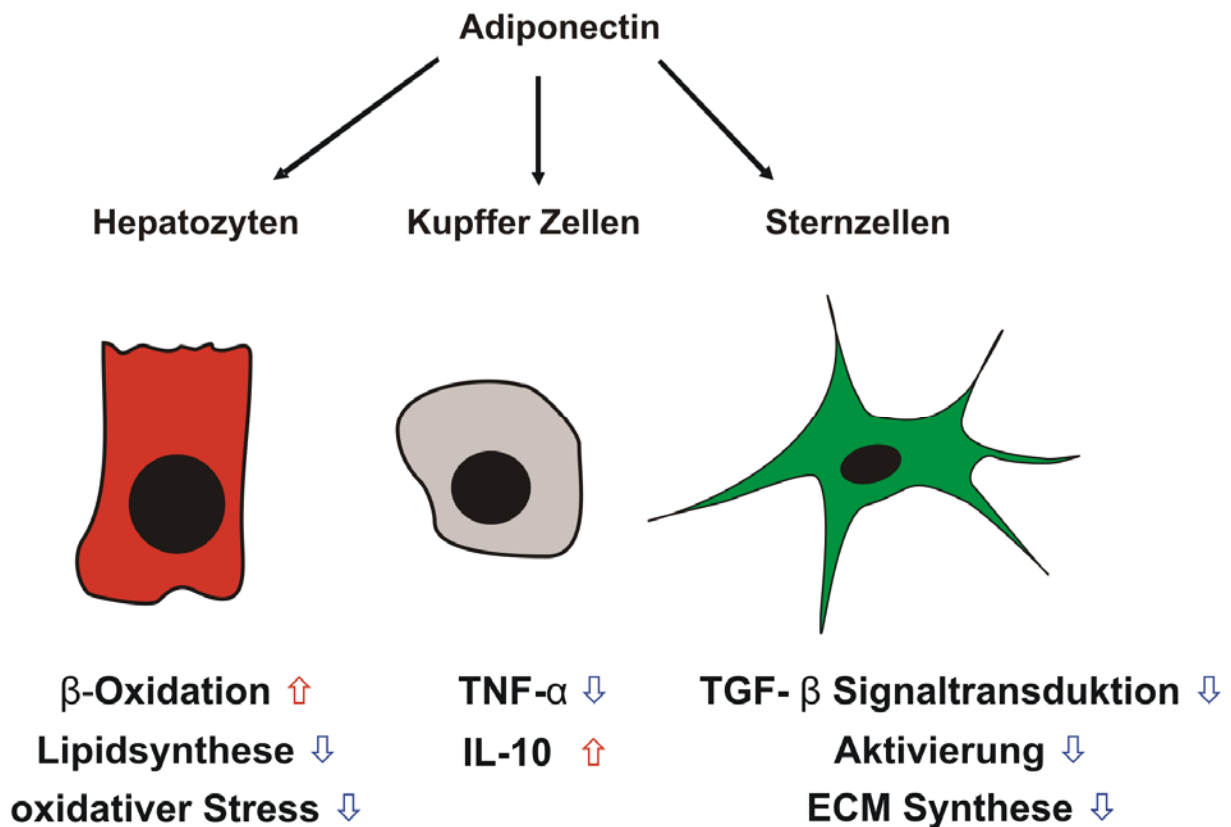


Abbildung 5: Protektive Wirkung von Adiponectin bei NASH.

Adiponectin erhöht in Hepatozyten die β -Oxidation, reprimiert die Lipidsynthese und senkt den oxidativen Stress. In Kupffer Zellen senkt Adiponectin die LPS induzierte Produktion von TNF- α und induziert Interleukin 10 (IL-10). In hepatischen Sternzellen wirkt Adiponectin der TGF- β Signaltransduktion entgegen und inhibiert dadurch deren Aktivierung und senkt damit die Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) in der Leber.

1.6 Chemerin

Chemerin zeigt in seiner Struktur wenig Homologie zu bereits bekannten Proteinen. Sie wird als reverse Chemokin Struktur bezeichnet. Es hat einen ungeordneten C-Terminus, der zwischen den Spezies hoch konserviert ist, darauf folgt ein β -Faltblatt und am N-Terminus eine α -Helix. Ebenso wie Chemokine dient Chemerin als Lockstoff für Leukozyten. Dabei ist die C-terminale Domäne entscheidend für seine chemotaktische Aktivität [47].

1.6.1 Proteolytische Prozessierung von Chemerin

Chemerin wird als 163 AS großes Prochemerin synthetisiert und nach Abspaltung einer 20 AS langen N-terminalen Signalsequenz als Prochemerin sezerniert. Um seine Wirkung zu entfalten kann es dann von verschiedenen Proteasen an verschiedenen Stellen am C-Terminus weiter prozessiert werden.

Diese Proteasen werden von den Zielzellen selbst freigesetzt oder sind am Wirkort gehäuft vorhanden. Die unterschiedlichen Chemerinisoformen unterscheiden sich in Funktion und Aktivität sehr stark voneinander. Serinproteasen, die von Leukozyten freigesetzt werden und in Wundherden vorhanden sind erzeugen Chemerinformen, die eine hohe chemotaktische Aktivität haben. Cysteinproteasen, die zum Beispiel von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden, erzeugen Isoformen, die eine anti-inflammatorische Wirkung zeigen. Neutrophile, die zu den Leukozyten gehören sind in der Regel als erste Immunzellen am Entzündungsherd. Wenn später die Makrophagen eintreffen ändert sich die Chemerinisoform und das Protein fördert das Abklingen der Entzündung [47].

1.6.2 Die Chemerinrezeptoren

Seine chemotaktische Aktivität entfaltet Chemerin über den G-Protein gekoppelten Rezeptor Chemokine like receptor 1 (CMKLR1), der von Makrophagen, Neutrophilen, NK Zellen und Dendritischen Zellen produziert wird. CMKLR1 zeigt phylogenetische Homologie mit einigen Rezeptoren für chemische Lockstoffe, wie zum Beispiel C5a-R, C3a-R und Formyl Peptide Receptor-Like 1 (FPR1).

Daneben konnte gezeigt werden, dass Chemerin auch an den G Protein Coupled Receptor 1 (GPR1) bindet und die Zelle daraufhin mit einer intrazellulären Calciumfreisetzung reagiert. Es ist jedoch noch keine biologische Funktion dieses Rezeptors bekannt.

Die Bindung von Chemerin an CCRL2 löst keine intrazelluläre Signalkaskade aus. Man nimmt an, dass Chemerin durch Bindung an diesen Rezeptor lokal angereichert wird und sich dadurch seine Wirkung über CMKLR1 verstärkt [47].

1.6.3 Mögliche Funktion von Chemerin bei der NAFLD

Der Befund, dass Chemerin im Serum von übergewichtigen Probanden erhöht ist und eine positive Korrelation zum BMI, zum Nüchterninsulin und den Triglyzeriden zeigt, während es negativ mit dem HDL-Cholesterin korreliert, lässt vermuten, dass dieses Protein in engem Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom steht [48].

Chemerin und sein Rezeptor CMKLR1 sind wichtig für die Adipogenese. Dies konnte durch Knock down der beiden Proteine in Präadipozyten gezeigt werden [49]. In reifen 3T3-L1 Adipozyten führt die Inkubation mit rekombinantem Chemerin zu einer Verminderung der PPAR- γ 2 mRNA Expression und einer erhöhten Lipolyse [50].

In humanen Endothelzellen fördert Chemerin die Angiogenese und induziert MMP-2 und MMP-9 [51].

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Chemerin in-vitro die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme in Adipozyten und Skelettmuskelzellen verminderte [52-53]. Im in-vivo Mausmodell verstärkte Chemerin die Glukose-Intoleranz, verminderte die Insulinsensitivität und verringerte die hepatische Glukoseaufnahme in ob/ob und db/db Tieren, nicht jedoch in Wildtyp Mäusen [53-54].

1.7 Therapiemöglichkeiten bei NAFLD

Metformin (N,N-dimethylbiguanide oder N,N-dimethylimidodicarbonimidic diamide [55]) ist eines der am häufigsten eingesetzten Medikamente bei der Behandlung von Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus. Die meisten Effekte in der Leber übt Metformin über die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AMPK aus. Da die AMPK natürlicherweise bei niedriger Energieladung der Zelle aktiviert wird, unterdrückt sie energieaufwendige Prozesse und leitet Stoffwechselwege ein, die den ATP-Spiegel in der Zelle erhöhen. Die AMPK inhibiert die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und ChREBP und die Enzyme ACC und HMG-CoA-Reduktase, wodurch die β -Oxidation erhöht und die Fettsäure- und Cholesterinsynthese unterdrückt wird. Außerdem reprimiert die AMPK die endogene Glukoseproduktion in Hepatozyten durch Reduktion der Expression der PEPCK und der Glukose-6-Phosphatase [56].

Fibrate, wie Fenofibrat, sind kleine, lipophile, organische Moleküle, die die Plasmamembran durchqueren können, im Kern an PPAR- α binden und so die Aktivierung von PPAR- α regulierten Genen auslösen. Dies führt beispielsweise zu einer erhöhten Transkription der Lipoprotein Lipase, der HDL-spezifischen Apolipoproteine A-I und A-II und zu einer Reduktion von Apolipoprotein B. Dadurch sinkt der Triglyzeridspiegel und die Menge an triglyzeridreichen Lipoproteinen wie VLDL, während sich der HDL-Spiegel erhöht [57].

Statine inhibieren kompetitiv die HMG-CoA Reduktase, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese katalysiert. Zudem induzieren Statine den LDL Rezeptor auf Hepatozyten und senken somit das proatherogene LDL Cholesterin im Serum [58].

Glitazone sind Agonisten des Kernrezeptors PPAR- γ . Behandlung mit Glitazonen führt bei Patienten zur Gewichtszunahme, da vermehrt Triglyzeride im Fettgewebe eingelagert werden und dort in Lipidtropfen gespeichert werden. Dadurch reduziert sich die Konzentration an freien Fettsäuren im Serum. Außerdem erhöhen Glitazone die Adiponectinplasmakonzentration. In der Leber spielt PPAR- γ eine untergeordnete Rolle, so dass durch den reduzierten Fluss von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe und erhöhtes Serum-Adiponectin der hepatische Lipidgehalt gesenkt wird. Dadurch wirken Glitazone Insulin sensitivierend auf die Leber [59-60].

Bei den meisten Patienten steht die NAFLD in engem Zusammenhang mit viszeraler Fettleibigkeit. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine zehnpromzentige Reduktion der Gesamtkörpermasse bei Fettleberpatienten zu einer 44 bis 58%igen Reduktion

der hepatischen Triglyzeride führt. Es zeigte sich aber auch, dass körperliches Training ohne Reduktion des Gesamtkörpergewichts zu verminderter viszeraler Fettleibigkeit führt und die Leberverfettung senkt. Dabei ergab sich eine inverse Korrelation zwischen der kardiorespiratorischen Fitness der Patienten und dem hepatischen Triglyzeridgehalt.

Bis heute gibt es keine Möglichkeit eine Leberfibrose oder gar eine Zirrhose effektiv zu behandeln. In der CCl₄- und der Thioacetamid-induzierten Leberfibrose in Ratten konnte jedoch die Überexpression von Insulin Wachstumsfaktor I (IGF-I) in-vivo eine bereits vorhandene starke Leberfibrose umkehren [61].

1.8 Ziel der Arbeit

In dieser Doktorarbeit wurde die Funktion von Adiponectin in der Pathogenese der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und der NASH-Progression untersucht. Dazu wurde die Expression der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 und die Adiponectinserumkonzentration in Patienten mit Steatose und Fibrose und in Mausmodellen für NASH und Fibrose bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss von Adiponectin auf Activin A und dessen Inhibitor Follistatin in Hepatozyten untersucht. Einen Großteil der Arbeit bildete die Untersuchung der Effekte von Adiponectin auf den TGF- β Signalweg. Dazu wurde der Einfluss von Adiponectin auf die Expression von CTGF und BAMBI in Hepatozyten und hepatischen Sternzellen untersucht und der direkte Effekt von Adiponectin auf die TGF- β vermittelte Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 in Hepatozyten bestimmt. Desweiteren wurde der Effekt von Adiponectin auf die Expression von Chemerin in Hepatozyten untersucht und der Einfluss von Chemerin auf die Insulinwirkung in diesen Zellen betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Amara Nucleofector I	Lonza
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
ELISA-Reader	Thermo Scientific
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Flüssigstickstoffanlage·ESPACE·600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37°C, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocell	Millipore
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	BIORAD
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler Typ VX 2E	Janke und Kunkel
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	BIORAD
SDS-Gelplatten und Zubehör	BIORAD
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf

Tischzentrifuge 5424
 Tischzentrifuge Biofuge Pico
 Ultraschallgerät mit Power Supply
 UV/Vis Photometer Ultraspec 2000
 UV-Flächenstrahler TFX-20 M
 Vakuumpumpe
 Vortex VF2
 Wasserbad WPE 45
 X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)
 Zellzählkammer, Tiefe 0,100 mm
 Zentrifuge Megafuge 1.0R

Eppendorf
 Heraeus Instruments
 Bandelin
 Pharmacia
 MWG-Biotech
 KNF Laboport
 Janke und Kunkel
 Memmert
 Siemens
 Neubauer
 Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)
 Biotyne® B Nylon Membran (0,45 µm)
 ELISA-Platte (96 Loch)
 Gel Blotting Papier
 Hyperfilm ECL™
 Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)
 Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)
 LightCycler® Kapillaren (20 µl)
 Parafilm
 Petriperm Zellkulturflaschen (75 cm²)
 Petrischalen (10 x 1,5 cm)
 Pipettenspitzen
 Pipettenspitzen
 Ready Gel 10% Gelatine
 Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)
 Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)
 Serologische Einwegpipetten (25 ml, 50ml)
 Sterile Einmalspritzen(1,0 ml)
 Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)
 Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 1000 µl)
 Sterile Kanülen
 Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose (0,2 µm)
 Vakuum Sterilfiltrationssystem (500 ml, 1000 ml)
 Zell Schaber
 Zellkulturflaschen (75 cm²)
 Zellkulturplatten (6-, 24-, 48 Loch)
 Zellkulturplatten (96 Loch)
 Zymography Entwicklungspuffer
 Zymography Probenpuffer

BD Falcon
 Pierce
 Corning Costar®
 Schleicher & Schuell BioScience
 Amersham Biosciences
 BIORAD
 BD Falcon
 Roche
 American National Can™
 Corning Costar®
 BD Falcon
 Eppendorf
 Sarstedt
 BIORAD
 Eppendorf
 Sarstedt
 Corning Costar®
 BD Plastipak
 Biozym Diagnostik
 Sarstedt
 BD Microlance™
 BIORAD
 Millipore
 Corning Costar®
 Sarstedt
 BD Falcon
 Corning Costar®
 BIORAD
 BIORAD

Zymogram Renaturierungspuffer

BIORAD

2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
AG 490 (JAK 2 Inhibitor)	Calbiochem®
AICAR	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	BIORAD
Ampicillin	Ratiopharm
Biosafe™ Coomassie	BIORAD
Bisacrylamidlösung (2%)	BIORAD
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Fraktion 5)	Biomol
BSA (Fraktion 5)	Roche
BSA (Fraktion 5)	Sigma
Collagen Typ I	Sigma
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
Dexamethason	Lonza
Difco™ LB Agar, Miller	BD Biosciences
Difco™ LB Broth, Miller	BD Biosciences
Dithiothreitol	Biorad
DNA-Leiter, 1kb	Invitrogen
DULBECCO'S-MEM	Biochrom AG
Essigsäure (99%)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
EGF	Lonza
FCS	Biochrom AG
Fenofibrat	Sigma
Fibronectin	Sigma
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
G-418	Calbiochem
Glutamin	Biochrom
Glutardialdehydlösung (50%)	Merck
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
HEPES	Sigma
Hydrocortison	Rotexmedica
Igepal	Sigma
Imidazol	Sigma

In Solution NF- κ B Inhibitor	Calbiochem
Insulin	Eli Lilly
Insulin	Lonza
Kaliumchlorid	Merck
Kollagen I	Sigma
Kupfer(II)sulfat	Sigma
LPS	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
Magnesiumchlorid	Sigma
Metformin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
MG 132 (Proteasomen Inhibitor)	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
PBS·DULBECCO	Biochrom·AG
PD 98059 (MEK Inhibitor)	Calbiochem
Phosphoethanolamin	Lonza
PMA	Sigma
RPMI 1640	Biochrom·AG
RU 486 (PPAR α Inhibitor)	Sigma
Salzsäure rauchend	Merck
SB 203580 (p38 MAP-Kinase Inhibitor)	Calbiochem®
SB 431542 (Alk 5 Inhibitor)	Biovision
SDS	Merck
SeaKem® LE Agarose	Biozym
SIS 3 (Smad 3 Inhibitor)	Sigma
S.O.C. Medium	Invitrogen
STAT3 Inhibitor VI	Calbiochem®
STAT3 Inhibitor Peptid	Calbiochem®
TEMED	Merck
Tris-HCl	Merck
Tris-NH ₃	Merck
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma
WY 14643 (PPAR α Agonist)	Calbiochem

Xylencyanol

Merck

2.1.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

2.1.4.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach:

Tris-NH ₃	121	g
Essigsäure (99%)	28,6	ml
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	50	ml
	ad 0,5	l ddH ₂ O

Gelladepuffer, 10-fach:

Glyzerin (87%)	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4.2 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

2.1.4.2.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten

RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4.2.2 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (2 x Lämmli), 2-fach [62]:

Glyzerin (87%)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der SDS-Probenpuffer wurde bei 4°C aufbewahrt und im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH ₂ O	32,0	ml

Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH ₂ O	28,5	ml

Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH ₂ O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenngels bzw. des Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugegeben.

2.1.4.2.3 Lösungen für Western-Blotting

Tank-Puffer, 10-fach [63]:

Glyzin	140	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

TBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l TBS

Blockierlösung P:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Blockierlösung T:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml TBST

Die Blockierlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

BSA-PBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

BSA-TBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l TBS

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Primäre Antikörper wurden in diesen Lösungen in der Regel im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

2.1.4.2.4 Lösungen für Activin A- und Chemerin Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

Waschpuffer:

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Die beiden Lösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung der Antikörper:

Der Capture AK wurde in PBS und der Detection AK in Reagent Diluent verdünnt, wie in der Vorschrift zu den Tests angegeben.

Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.4.2.5 Lösungen für TGF-β1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

Aktivierungsreagenzien:

HCl	1 M
-----	-----

NaOH/0,5 M HEPES	1,2 M
Essigsäure/10 M Harnstoff	2,5 M
NaOH/1 M HEPES	2,7 M

Waschpuffer:

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Blockpuffer:

Tween® 20	50	ml
	ad 1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	7	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Die beiden Lösungen (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung der Antikörper:

Der Capture AK wurde in PBS und der Detection AK in Reagent Diluent verdünnt, wie in der Vorschrift zu den Tests angegeben.

Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.4.2.6 Lösungen für die Präparation von Kernextrakten

Hypertonischer Waschpuffer:

HEPES, 0,1 M Stammlösung pH 7,9	5,0	ml
Magnesiumchlorid, 1 M Stammlösung	75,0	µl
Kaliumchlorid, 1 M Stammlösung	166,5	µl
Dithiothreitol, 1 M Stammlösung	25,0	µl
	ad 50	ml ddH ₂ O

Lysepuffer:

HEPES, 0,1 M Stammlösung pH 7,9	1,0	ml
Magnesiumchlorid, 1 M Stammlösung	7,5	µl
Dithiothreitol, 1 M Stammlösung	2,5	µl
EDTA, 0,5 M Stammlösung	2,0	µl
Natriumchlorid, 3 M Stammlösung	0,7	ml
Glycerin, 50%	0,1	ml
	ad 5	ml ddH ₂ O

Aufbewahrungspuffer

HEPES, 0,1 M Stammlösung pH 7,9	1,0	ml
Kaliumchlorid, 1 M Stammlösung	83,5	µl
Dithiothreitol, 1 M Stammlösung	2,5	µl
EDTA, 0,5 M Stammlösung	2,0	µl
Glycerin, 50%	0,2	ml
	ad 5	ml ddH ₂ O

Waschpuffer mit Igepal

Hypertonischer Waschpuffer	0,5	ml
Igepal	5,0	µl

Die Stammlösungen wurden durch lösen der Chemikalien in ddH₂O erstellt. Dem hypertonischen Waschpuffer, dem Lysepuffer und dem Aufbewahrungspuffer wurde jeweils eine Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette beigemischt.

Die Lösungen wurden auf Eis gekühlt und vor jeder Extraktion neu hergestellt.

2.1.4.2.7 Lösungen für die Gelatine Zymographie

Zymographie Lysepuffer:

Tris HCl	50 mM
Calciumchlorid	5 mM
Natriumchlorid	200 mM
Triton X-100	1%
	pH 7,5

Der Puffer wurde bei RT aufbewahrt.

2.1.5 Kulturmedien

2.1.5.1 Medien für humane Zellen

Die hepatozytären Zellen HepG2, HUH7, Hep3B und PLC wurden in RPMI 1640 unter Zusatz von 10% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) kultiviert. Die hepatozytäre Zelllinie NeHepLxHT wurde in DMEM:F12 unter Zusatz von 0,1 µl/ml Dexamethason, 0,11 µl/ml Insulin, 50 µg/ml G-418, 10% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) kultiviert. Primäre humane Hepatozyten wurden in DULBECCO'S MEM (DMEM) Hoch-Glukose Medium mit 4 ng/ml Hydrokortison, 1,67 mU/ml Insulin, 2 mM Glutamin, 5% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) kultiviert.

Primäre hepatische Sternzellen wurden kultiviert in DULBECCO'S MEM (DMEM) Niedrig-Glukose Medium mit 10% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium).

2.1.5.2 Zellkulturflaschen für humane Zellen

Die Zelllinien HepG2, HUH7, Hep3B, PLC und primäre humane hepatische Sternzellen wurden in Cell+ -Flaschen und -Platten von Sarstedt kultiviert. Zur Kultivierung der Zelllinie NeHepLxHT wurden diese Flaschen und Platten über Nacht bei 4°C mit 0,1% Kollagen I gelöst in 0,1 M Essigsäure beschichtet. Dazu wurde 1 ml Lösung für 25 cm² Kultivierungsfläche verwendet. Für die Zelllinie THLE-3 wurden die Cell+ Flaschen und -Platten über Nacht bei 37°C mit 0,01 mg/ml Fibronectin, 0,03 mg/ml Kollagen I und 0,01 mg/ml Rinderserumalbumin, verdünnt in Kulturmedium, beschichtet. Dazu wurden 2 ml

Lösung für 25 cm² Kultivierungsfläche verwendet. Die primären Hepatozyten wurden in Kollagen I beschichteten 6-Loch oder 12-Loch Platten von Biocat kultiviert.

2.1.5.3 Medien für *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in Luria-Broth-Flüssigmedium (LB-Medium) bzw. auf Luria-Broth-Agarplatten (LB-Agar).

LB-Medium:	25	g Luria-Broth-Base
	ad 1	l ddH ₂ O

LB-Agar:	25	g Luria-Broth-Agar
	ad 1	l ddH ₂ O

Zur Selektion plasmidtragender Klone wurde dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar nach dem Autoklavieren zusätzlich Ampicillin zugefügt. Die Antibiotika-Stammlösung in ddH₂O (100 mg/ml) wurde im Verhältnis 1:1000 mit dem Medium bzw. dem Agar vermischt. Die Endkonzentration im Medium betrug 100 µg/ml.

2.1.6 Enzyme, Antikörper und Proteine

2.1.6.1 Enzyme

Restriktionsenzym <i>PstI</i>	Roche
Restriktionsenzym <i>BamHI</i>	Roche
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	Roche

2.1.6.2 Primäre Antikörper

Anti-Human AdipoR1 polyklonaler AK (Kaninchen)	Pineda AK-Service
Anti-Human AdipoR2 polyklonaler AK (Kaninchen)	IBL
Anti-Human BAMBI monoklonaler AK (Maus)	Abcam
Anti-Human BAMBI monoklonaler AK (Maus)	Abnova
Anti-Human β-Actin polyklonaler AK (Kaninchen)	Cell Signaling
Anti-Human Chemerin polyklonaler AK (Ziege)	R & D Systems
Anti-Maus Chemerin polyklonaler AK (Ziege)	R & D Systems
Anti-Human CMKLR1 polyklonaler AK (Kaninchen)	Abcam
Anti-Human CTGF monoklonaler AK (Maus)	Novus
Anti-Human GAPDH monoklonaler AK (Kaninchen)	Cell Signaling
Anti-Human p65 polyklonaler AK (Kaninchen)	Acris

2.1.6.3 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research

2.1.6.4 Proteine und Peptide

Rekombinantes humanes Adiponectin	R&D Systems
Rekombinantes humanes Chemerin	R&D Systems
Rekombinantes humanes IL-6	R&D Systems
Rekombinantes humanes Leptin	R&D Systems
Rekombinantes humanes TGF- β 1	R&D Systems
Rekombinantes humanes TNF- α	R&D Systems

Außerdem wurde trimeres Adiponectin (LMW-APM) verwendet, dass im Labor mit Hilfe des Baculovirensystems hergestellt wurde [31].

2.1.7 Kit-Systeme

BCA Protein Assay	Thermo Scientific
DuoSet® ELISA Development System human Activin A	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Chemerin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human TGF- β 1	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
Nuclear Extract Kit	Active Motif
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Mouse Hepatocyte Nucleofector Kit	Lonza
pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit	Invitrogen
PCR Core Kit	Roche
QuantiChrom Glucose Assay Kit	BioAssay Systems
Quantikine human Follistatin Immunoassay Kit	R&D Systems
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

2.1.8 Organismen

2.1.8.1 Humane Zellen

Die verwendeten humanen Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert.

Primäre subkutane Adipozyten	BioCat
Primäre Hepatozyten	Klinikum Regensburg (Chirurgie)
Primäre hepatische Sternzellen	Klinikum Regensburg (Innere Medizin I)
HepG2	hepatozytäre Zelllinie (American Type Culture Collection)
Hep3B	hepatozytäre Zelllinie (American Type Culture Collection)
HUH7	hepatozytäre Zelllinie (American Type Culture Collection)
NeHepLxHT	hepatozytäre Zelllinie (American Type Culture Collection)
PLC	hepatozytäre Zelllinie (American Type Culture Collection)

2.1.8.2 Bakterien

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C.

<i>E.coli</i> Stämme	Marker
TOPO 10 Cells	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

2.1.9 Humanes Probenmaterial

2.1.9.1 Humane Lebergewebsproben

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Lebergewebe wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Weiss (Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) meist von Spendern mit Lebermetastasen von gastrointestinalen Primärtumoren aus dem der Metastase angrenzenden Gewebe gewonnen.

Die Gewebe wurden nach der Biopsie in nicht verfettete Leber, Fettleber und fibrotische Leber eingeteilt. Außerdem wurden die Patienten untersucht auf Fettleibigkeit, Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck und Hyperurikämie. Weitere Nebendiagnosen, sowie die Medikation wurden ebenfalls festgehalten.

Tabelle 1:

Diagnose	Geschlecht	Alter	Größe [48]	Gewicht [16]	BMI	Diabetes mellitus Typ 2
Kontrolle	w	52	173	72	24	nein
Kontrolle	w	35	161	58	22	nein
Kontrolle	w	57	150	49	22	nein
Kontrolle	w	77	163	89	33	nein
Kontrolle	w	37	173	71	24	nein
Kontrolle	m	64	178	67	21	nein
Kontrolle	m	67	176	76	25	ja
Kontrolle	m	54	179	95	30	nein
Fettleber	w	75	162	75	29	ja
Fettleber	w	58	168	70	25	nein
Fettleber	m	73	174	85	28	nein
Fettleber	m	52	176	95	31	nein
Fettleber	m	33	186	110	32	nein
Fettleber	m	72	175	104	34	nein
Fettleber	m	69	182	87	26	ja
<u>Fibrose</u>	<u>w</u>	<u>35</u>	<u>158</u>	<u>83</u>	<u>33</u>	<u>nein</u>
<u>Fibrose</u>	<u>m</u>	<u>82</u>	<u>154</u>	<u>84</u>	<u>35</u>	<u>nein</u>

<u>Fibrose</u>	<u>m</u>	<u>64</u>	<u>172</u>	<u>77</u>	<u>26</u>	<u>nein</u>
-----------------------	-----------------	------------------	-------------------	------------------	------------------	--------------------

Tabelle 1: Patientendaten zu den Lebergewebsproben von Spendern mit Fettleber, fibrotischer Leber und Personen ohne Leberverfettung, die für Western Blot Analysen und Zymographie verwendet wurden.

2.1.9.2 Humane Serumproben

Die humanen Serumproben wurden zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Hellerbrand (Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg).

Mit Hilfe von Ultraschalluntersuchung konnte Frau Dr. D. Schacherer feststellen ob die Patienten eine Fettleber entwickelt hatten (erhöhter Schallwiderstand in der Leber im Vergleich zur Niere) oder nicht (gleicher Schallwiderstand von Leber und Niere).

Alter, Geschlecht, BMI, WHR, Blutdruck und Erkrankungen der Patienten wurden festgehalten. Außerdem wurde die genaue Alkoholmenge erfragt, welche die Patienten konsumierten. Anhand dieser Angaben konnten die Fettleberpatienten in nicht alkoholische und alkoholische Fettleberpatienten unterteilt werden.

Tabelle 2:

Diagnose	Kontrolle	Fettleber	p-Wert
Anzahl	23	25	
Geschlecht (♀/♂)	7/16	16/9	
Alter (Jahren)	58 (25-88)	60 (29 – 80)	
BMI (kg/m ²)	25,6 (21,3-38,1)	27,7 (10,3 – 35,8)	
Bauch zu Hüftumfang Rate	0,93 (0,73-1,18)	0,98 (0,8-1,16)	
Steatosegrad 0/1/2	23/0/0	0/14/11	
Albumin (g/l)	46,8 (34,8-56,0)	46,0 (31,6 – 61,6)	
GGT (U/l)	36 (8-136)	32 (8-160)	
ALT (U/l)	20 (12 -44)	24 (12 – 112)	0,013

AST (U/l)	28 (16 -48)	32 (2.0 – 56)	0,026
AP (U/l)	76 (40-132)	72 (51 – 156)	
LDL (mg/dl)	108 (44-340)	96 (48 – 216)	
VLDL(mg/dl)	44 (16-96)	52 (32-92)	
Triglyzeride (mg/dl)	108 (56-240)	128 (56-392)	

Tabelle 2: Patientendaten zu den Serumproben der Spender mit und ohne sonographisch diagnostizierter Fettleber, die für ELISA Messungen von Activin A, Follistatin und Adiponectin verwendet wurden. (Alanin Aminotransferase, ALT; Alkalische Phosphatase, AP; Aspartat Aminotransferase, AST; Gamma Glutamyltransferase, GGT. Steatosegrad 0: keine Steatose: kein Unterschied zwischen hepatischem Schallwiderstand und Schallwiderstand der Niere, Steatosegrad 1: leichte Steatose: leicht erhöhter hepatischer Schallwiderstand, Steatosegrad 2: fortgeschrittene Steatose: stark erhöhter hepatischer Schallwiderstand.)

2.1.10 Murines Probenmaterial

Das murine Probenmaterial wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Hellerbrand zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche wurden dabei von Dr. C. Dorn durchgeführt.

2.1.10.1 Mäuse auf Paigen Diät

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Lebergewebe und Serum von C57/Bl6 Weibchen verwendet, die 16 Wochen mit Paigen Diät ernährt wurden. Diese Diät zeichnet sich dadurch aus, dass sie neben einem erhöhten Fettanteil (17%) auch noch eine sehr hohe Menge an Cholesterin enthält (1,25%) und zudem 0,5% Natriumcholat zugesetzt wurden. Die Fütterung dieser Diät führt in der Leber zu einer Verfettung und einer Entzündung, wodurch man sie als Modell für eine NASH bezeichnen kann.

2.1.10.2 Mäuse auf Methionin und Cholin defizienter (MCD) Diät

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch Serum und Lebergewebe von C57/Bl6 Weibchen verwendet, die 14 Wochen auf MCD Diät gehalten wurden. Bei der MCD Diät kommt es durch eine gestörte VLDL Sekretion aufgrund des Fehlens von Phosphatidylcholin zu einer schnellen Verfettung der Leber, die bald darauf mit einer Entzündung einher geht. Nach 14 Wochen haben die Mäuse bereits eine fortgeschrittene Leberfibrose.

2.1.11 Transfektionsreagenzien

Fugene HD	Roche
Xtreme Gene siRNA Transfection	Roche

2.1.12 siRNAs

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden von der Firma Ambion (UK) hergestellt.

Zielgen	siRNA-Sequenz (5' → 3')
AdipoR1	
sense	CCUCUUAGAGAAUUCAGUAtt
antisense	UACUGAAUUCUCUAAGAGGtt
AdipoR2	
sense	CCAACUGGAUGGUACACGAtt
antisense	UCGUGUACCAUCCAGUUGGtg
Chemerin	
sense	GAAGAAACCCGAGUGCAAAtt
antisense	UUUGCACUCGGGUUUCUUCca

2.1.13 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

2.1.13.1 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von 233 bis 311 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Außerdem wurden die Primer so entworfen, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug (Primer: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Firma GeneArt (Regensburg) verifiziert.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
Activin A		
Activin A_uni	CTGGCATGTCTTCCCTGTCT	233 bp
Activin A_rev	GCATGAGGAAAGGTCTGTGC	
AdipoR1		
AdipoR1_uni	GGGGAATTCTCTTCCCACAAAGGATCTGTGGTG	311 bp
AdipoR1_rev	GGGCTGCAGTTAAGTTTCTGTATGAATGCGGAAGAT	
AdipoR2		
AdipoR2_uni	GGGGAATTCAACAGACCAACAGAAAACCGATTG	303 bp
AdipoR2_rev	GGGCTGCAGCTAAATGTTGCCTGTTTCTGTGTGTAT	
BAMBI		
BAMBI_uni	CGCCACTCCAGCTACATCTT	233 bp
BAMBI_rev	CGCCACTCCAGCTACATCTT	
β-Aktin		
β-Aktin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG	300 bp
β-Aktin_rev	CGCACGATTTCCTCTCAGCTC	
CTGF		
CTGF_uni	CTCCTGCAGGCTAGAGAAGC	251 bp
CTGF_rev	CGTCAGGGCACTTGAAGTC	
Chemerin		
Chemerin_uni	GGTCCACTGCCCCATAGAG	289 bp
Chemerin_rev	TTATCATGGCTGGGGATAGAA	
CMKLR1		

CMKLR1_uni	ACCTGCATGGGAAAATATCCT	299 bp
CMKLR1_rev	GAGGTTGAGTGTGTGGTAGGG	
TGF- β 1		278 bp
TGF- β 1_uni	ACTGCAAGTGGACATCAACG	
TGF- β 1_rev	GGGTTATGCTGGTTGTAC	

2.1.13.2 Primer für konventionelle PCR

Die genaue Übereinstimmung des PCR Produkts mit der gewünschten protein codierenden Sequenz, wurde überprüft durch Sequenzierung des PCR Produkts.

PCR Produkt	Sequenz (5' → 3')	Größe
BAMBI		780 bp
BAMBI_uni	ATGGATCGCCACTCCAGCTA	
BAMBI_rev	TACGAATTCCAGCTTCCCGTG	

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli*-Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C in einem Brutschrank. Um Einzelkolonien zu erhalten, z.B. nach einer Transformation, wurden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Dem Agar zugesetztes Antibiotikum erlaubte eine positive Selektion der plasmidtragenden Bakterien, da nur Zellen mit der durch das Plasmid vermittelten Resistenz wachsen konnten. Zur weiteren Vermehrung eines Klons wurde die Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte in Flüssigmedium überführt, das das gleiche Antibiotikum enthielt.

2.2.1.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Humane Zellen stellen an ihre Kultivierung größere Ansprüche. Sie benötigen eine konstante Temperatur von 37°C, dazu eine Atmosphäre mit hoher Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂-Gehalt. Sie wachsen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit 10 ml Medium. Die Kultivierung erfolgt in einem speziellen Brutschrank.

Die Passagierung erfolgte nach 3-4 Tagen, wenn der Zellmonolayer 80-90% des Flaschenbodens bedeckte. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Das Trypsin löst die Zellen vom Boden ab und spaltet die Zell-Zell-Kontakte auf, wodurch sich die Zellen ablösen. Die Zellen wurden in ein Gefäß, in dem 3 ml Medium mit Serum (10%) vorgelegt wurden, überführt. Serum inaktiviert das Trypsin, damit die Zellen keinen weiteren Schaden nehmen. Nach dem Zentrifugieren (289 g, 5 min) wurden die Zellen resuspendiert und auf die neuen Flaschen verteilt. Die Passagierung erfolgte im Verhältnis 1:3 bis 1:5.

Für Stimulationsversuche oder die Transfektion mit Plasmiden wurden die Zellen nach dem Resuspendieren in 6- bzw. 12-Loch-Platten ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Inkubationsschrank bebrütet. Während dieses Vorgangs werden die Zellen adhärent und bilden am Boden der Platte einen Monolayer aus. Vor der Stimulation wurden die Zellen 24 h in Medium ohne Zusätze und ohne FCS kultiviert. Unmittelbar vor der Stimulation wurde das Medium noch einmal durch frisches Medium ersetzt.

2.2.1.3 Kultivierung primärer humaner Hepatozyten

Die Zellen wurden über Nacht in Medium im Brutschrank inkubiert. Dabei bilden sie am Boden der Platte einen Monolayer aus. Vor der Stimulation wurden die Zellen 24 h in Medium ohne Zusätze und ohne FCS kultiviert. Unmittelbar vor der Stimulation wurde das Medium noch einmal durch frisches Medium ersetzt.

2.2.1.4 Bestimmung der Nekroserate in primären humanen Hepatozyten

Zur Bestimmung der Nekroserate der primären humanen Hepatozyten in der in-vitro Kultur wurde die Laktat Dehydrogenaseaktivität (LDH) in den Überständen dieser Zellen mit dem Zytotoxizitäts Detektions Kit von Roche gemessen. Nekrotische Zellen lysieren, wodurch das zytoplasmatische Enzym Laktat Dehydrogenase in den Zellüberstand gelangt. Die Aktivität der LDH in den Überständen dieser Zellen wurde gemessen durch die Umsetzung von Tetrazonium Salz in Formazan. Das Ausmaß dieser durch die LDH katalysierten Reaktion spiegelt sich in der Intensität der Rotfärbung der Lösung wieder und diese kann durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert werden.

2.2.1.5 Kultivierung primärer humaner hepatischer Sternzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären humanen hepatischen Sternzellen wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Hellerbrand (Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) kultiviert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Die Zellen wurden dann in Cell+ -beschichteten Flaschen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Durch den Entzug der extrazellulären Matrix in der in vitro Kultur nehmen die Zellen ihren aktivierten fibroblastenartigen Phänotyp an. Für Stimulationsversuche wurden die Zellen dann mit 3 ml Trypsin/EDTA (Gibco) abgelöst, in Medium abzentrifugiert und in Cell+ -beschichtete 6-Loch Platten ausplattiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen 24 h in Medium ohne FCS kultiviert und unmittelbar vor dem Versuch wurde das Medium noch einmal durch frisches Medium ersetzt.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Ausgehend von 3 ml Übernachtskultur wurde die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [64]: die Bakterienzellen werden zunächst mit Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen, und die chromosomale DNA und die Proteine durch eine nachfolgende Neutralisation mit Natriumacetat ausgefällt. Anschließend wird die Plasmid-DNA an eine Silikamembran gebunden und verbliebene Verunreinigungen durch Waschen der Membran entfernt. Der Reinheitsgrad der erhaltenen Plasmid-DNA ist ausreichend für Klonierungen und Sequenzierungen.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Lösung im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt und die Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser als Referenz gemessen.

Mit dem Lambert-Beerschen Gesetz konnte dann ausgehend von der gemessenen Extinktion bei 260 nm und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (V) und des für doppelsträngige DNA spezifischen Extinktionsfaktors von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (ϵ_{dsDNA}) die DNA-Konzentration (c_{dsDNA}) berechnet werden.

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{dsDNA}} \cdot V$$

c_{dsDNA} : Konzentration an dsDNA in der Lösung [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]

E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient von dsDNA, gleich $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

V: Verdünnungsfaktor, hier 100

Die Reinheit der DNA konnte durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Bei reiner, nicht degradierter DNA liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} zwischen 1,8 und 2,1.

2.2.2.3 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach dem Hitzeschockverfahren durchgeführt.

Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA vermischt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 30 min auf Eis gehalten, dann bei 42°C für 45 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach der Transformation wurden die Zellen in 0,9 ml S.O.C.-Medium ohne Zusatz von Antibiotika bei 37°C für 1 h unter Schütteln inkubiert, bevor sie zur positiven Selektion der erfolgreich transformierten Zellen auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert wurden.

2.2.2.4 Inkubation mit Restriktionsenzymen

Definierte Schnitte wurden in eine DNA mit Restriktionsendonukleasen eingeführt. Die DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen bei 37°C für 60 min inkubiert, und die erhaltenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Größe von DNA-Molekülen konnte durch die Auftrennung der DNA in 1,5%igen Agarosegelen analysiert werden. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Die noch heiße Gellösung wurde dann mit 1 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) versetzt und in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach Abschluß der Polymerisation wurde das Gel in die Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden in Gelladepuffer aufgenommen, in die Taschen gefüllt und bei einer Spannung von 80 V im Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde neben den Proben auch eine 1 kb-DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen. Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente konnten dann über einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.2.6 Einbringung von PCR Produkten in pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Der Plasmid Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO ist zunächst in linearisierter Form mit 3'-Thymidin Überhängen vorhanden. Das Enzym Topoisomerase ist kovalent an den Vektor gebunden. Die Topoisomerase I aus dem Vaccina Virus bindet doppelsträngige DNA und spaltet eine Phosphodiesterbindung nach 5'-CCCTT. Die Energie des 3'-Phosphats wird durch eine kovalente Bindung an TYR-274 des Enzyms konserviert. Die Phosphotyrosylbindung zwischen DNA und Enzym kann nun vom 5'-OH des PCR Produkts angegriffen werden.

Ein Ligationsansatz enthielt:

ddH ₂ O	3	μl
Puffer	1	μl
PCR Produkt	1	μl
Vektor	1	μl

Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

2.2.2.7 Transfektion von HepG2 Zellen mit pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Die Transfektion von humanen Zelllinien mit Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz Fugene HD von Roche durchgeführt.

Ein Reaktionsansatz enthielt:

Plasmid-DNA	2	μg
FugeneHD	10	μl
	ad 100	μl RPMI 1640+10%FCS

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Cup 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 900 μl RPMI 1640 mit 10% FCS auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann 72 h mit dem Transfektionsansatz im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.8 Standard PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Die Standard PCR wurde eingesetzt um den proteincodierenden Bereich einer mRNA, nachdem sie mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, zu amplifizieren. Für die Reaktion wurde der PCR Core Kit von Roche verwendet. Ein Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus:

5xGC Puffer	10	μl
universe Primer, 1μM	5	μl
reverse Primer, 1μM	5	μl
dNTPs	1	μl
DMSO	1	μl
MgCl ₂ , 1mM	1	μl
Phusion Polymerase	0,5	μl
cDNA	2	μl
ddH ₂ O	24,5	μl

Die Reaktion lief in PCR Cups ab. In der Reaktionskammer wurden die Proben zunächst für 10 min auf 98°C erhitzt, um die Phusion-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 35 Amplifizierungszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus setzte sich aus 10 s Denaturierungsphase bei 98°C, 30 s Annealingphase bei 61°C und 45 s Elongationsphase bei 72°C zusammen.

Durch Zugabe von 0,7 units Taq Polymerase und einmaliges Erhitzen auf 72°C für 10 min wurden dem PCR Produkt ein 3'überhängendes Adenin angehängt um es für die Ligation in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO vorzubereiten.

2.2.2.9 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR ist ein Verfahren zur schnellen, sensitiven und reproduzierbaren Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Amplifikation des PCR-Produkts kann während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt werden, und die absoluten bzw. relativen Mengen an DNA im eingesetzten Probenmaterial anhand einer Standardkurve berechnet werden.

Für alle Versuche wurde der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Im Folgenden ist ein typischer Reaktionsansatz wiedergegeben:

Reaktionsmix (Roche)	2	μl
MgCl ₂ , 25 mM	2,4	μl
universe Primer, 5 pmol/μl	1	μl
reverse Primer, 5 pmol/μl	1	μl
cDNA	2	μl
ddH ₂ O	11,6	μl

SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix bereits enthalten. Die Reaktion lief in dünnen Glaskapillaren ab, die über ein Probenkarussell in die Reaktionskammer eingebracht wurden. In der Reaktionskammer wurden die Proben zunächst für 10 min auf 95°C erhitzt, um die HotStart Taq-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus setzte sich aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammen. Die exakte Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des für die jeweilige Reaktion verwendeten Primerpaares.

Zur Berechnung der Ausgangskonzentration an cDNA wurde in jedem Amplifikationszyklus nach Abschluß der Elongationsphase, bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C), die Fluoreszenz der Probe gemessen. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I in doppelsträngige DNA-Moleküle einlagert, verhält sich dessen Fluoreszenzintensität proportional zur Bildung des PCR-Produktes. Die Messung der Fluoreszenz ermöglichte es so die Amplifikation während des gesamten Reaktionsverlaufs zu verfolgen.

Eine Auftragung der Fluoreszenzmeßwerte in einem Graphen gegen die Zyklenzahl ermöglichte es den Crossing Point (Cp) während der Exponentialphase der PCR zu bestimmen. Der Cp bezeichnet den Reaktionszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts einen deutlich positiven Wert über der Hintergrundfluoreszenz des Meßsystems annimmt, und ist proportional zur Ausgangskonzentration der Nukleinsäure im eingesetzten Probenmaterial. Verschiedene Proben unterscheiden sich in ihren Cp-Werten, da eine unterschiedliche Zahl an Amplifikationszyklen benötigt wird, um in Abhängigkeit von ihrer Ausgangskonzentration an Nukleinsäuren diese Detektionsschwelle zu erreichen.

Als Standard wurde bei jedem Lauf eine 1:1-Verdünnungsreihe von primärer hepatozytärer cDNA in Wasser mitgeführt. Jedem der vier Standardproben wurde hierbei ein arbiträrer Konzentrationswert zugewiesen. Über eine Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus der Konzentration wurde nun eine Standardkurve erstellt, die jedem Cp-Wert der Proben einen entsprechenden Zahlenwert für die relative Konzentration zuordnete. Diese Umrechnung der Cp-Werte mit Hilfe der Standardkurve in definierte Zahlenwerte erlaubt es, PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Effizienzen zu vergleichen.

Neben der mRNA des Zielgens wurde in den Proben parallel auch die mRNA eines Housekeeping Gens bestimmt. Ein Housekeeping Gen wird durch die verwendete Stimulation der Zellen nicht reguliert. Die Expression des Zielgens wurde relativ zur Expression dieses Referenzgens berechnet. Der Quotient aus Konzentration $cDNA_{\text{Zielgen}}$ zu Konzentration

cDNA_{Housekeeping Gen} gibt somit einen zum Referenzgen normalisierten Wert wieder, der für Qualitäts- und Quantitätsunterschiede, die während der Probenvorbereitung auftreten, korrigiert ist.

Der Quotient der normalisierten Werte von stimulierter Probe gegen unstimulierte Kontrolle wiederum drückt die relative Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der Stimulierung aus.

Nach der Amplifizierung wurde bei jedem Lauf noch die Spezifität des PCR-Produktes anhand einer Schmelzkurve analysiert. Die DNA wurde langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz während diese Phase kontinuierlich gemessen. Bei einer spezifischen Reaktion wird nur ein Produkt gebildet. Dieses schmilzt bei einer charakteristischen Temperatur, wodurch die Fluoreszenz abrupt abnimmt. Eine unspezifische Reaktion ist dagegen durch mehrere Produkte mit unterschiedlichen Schmelzpunkten gekennzeichnet, die zu einer unscharfen Abnahme der Fluoreszenz über mehrere Stufen führt.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Gesamt-RNA aus primären humanen Hepatozyten wurde mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen isoliert. Die Zellen wurden mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, mit PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer lysiert. Anschließend wurde die genomische DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Lysats mit einer dünnen Kanüle geschert und die RNA nach Angaben des Herstellers über Säulchentechnik isoliert. Die RNA wurde zweimal mit je 25 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) von dem Säulchen eluiert und bei -80° aufbewahrt.

Die Gesamt RNA aus Lebergewebe wurde mittels Phenolextraktion isoliert. Dazu wurden 100 mg Lebergewebe in 1 ml Trizol Reagenz von Roche homogenisiert. Mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze und einer Nadel mit einem Durchmesser von 0,4 mm wurde die genomische DNA geschert. Danach wurde der Ansatz mit 200 µl Chloroform vermischt und 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Dabei bildet sich eine wässrige Phase, in der die Nukleinsäuren gelöst sind. Zu dieser wässrigen Phase wurde erneut im Anteil 1:5 Chloroform zugegeben und zentrifugiert, wodurch Reste von Phenol ausgewaschen wurden. Anschließend wurde die nukleinsäurehaltige Phase mit 0,7 Anteilen Isopropanol versetzt und der Ansatz 2 h bei -20°C inkubiert. Durch die Zugabe von Isopropanol erhöht man den unpolaren Anteil der Lösung,

wodurch sich die Löslichkeit der polaren Nukleinsäuren verringert. Bei einer Temperatur von -20°C fallen diese Moleküle schließlich aus und können dann bei 13000 g und einer Zentrifugationszeit von 30 min pelletiert werden. Das Pellet aus Nukleinsäuremolekülen wurde dann noch zweimal mit 70% igem Ethanol gewaschen. Dabei gehen Reste von Phenol in Lösung, während die Nukleinsäuren ungelöst bleiben. Das Pellet wurde schließlich mit 100 μl nuklasefreiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration einer Lösung wurde wie die DNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 1:100–Verdünnung in nukleasefreiem Wasser bestimmt.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte ebenfalls mit dem Lambert-Beerschen Gesetz. Jedoch wurde nun der für RNA spezifische Extinktionskoeffizient von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ in die Formel eingesetzt.

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

c_{RNA} :	Konzentration an RNA in der Lösung [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
E_{260} :	Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
ϵ_{RNA} :	Extinktionskoeffizient von RNA, gleich $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
V:	Verdünnungsfaktor, hier 100

2.2.3.3 Reverse Transkription

Für den Einsatz in PCR-Reaktionen, z.B. in Real-Time RT-PCR, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit der Reversen Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Reverse Transcription Systems von Promega durchgeführt. Als Primer wurden Random Hexamer Primer eingesetzt, die an komplementären Sequenzen innerhalb der RNA-Moleküle hybridisierten und als Ausgangspunkt für die Synthese des cDNA-Stranges an der RNA-Matrize durch die Reverse Transkriptase dienten. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl ₂ , 25 mM	8	μl
RT-Puffer, 10 x	4	μl
dNTP-Mix, 10 mM	4	μl
Random Hexamer Primer, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1	μl
RNAsin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/ μl	0,5	μl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/ μl	1,2	μl
RNA (0,5 bzw. 1 μg) in nukleasefreiem Wasser	21,3	μl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde die AMV-RT durch fünfminütige Inkubation bei 95°C hitzeinaktiviert und die cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Transfektion primärer humaner Hepatozyten mit siRNA

Bei der siRNA-Transfektion wird doppelsträngige RNA, deren Sequenz einem bestimmten mRNA Abschnitt entspricht, in die Zellen eingebracht. Zelleigene Enzyme bauen die doppelsträngige RNA dann in Fragmente von circa 20 Nukleotiden Länge ab und transportieren diese dann zu weiteren komplementären Sequenzen, die dann ebenfalls durch diese Enzyme degradiert werden. Somit ist es möglich die Expression von ausgewählten Proteinen zu unterdrücken.

2.2.3.4.1 Transfektion mit Transfektionsreagenz

Die Transfektionen der siRNAs wurden mit dem Transfektionsreagenz X-treme Gene siRNA Transfection von Roche durchgeführt. Ein Reaktionsansatz für die Transfektion primärer humaner Hepatozyten enthielt:

siRNA 10 µM	10 µl
X-treme	2,5 µl
	ad 100 µl DMEM

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Cup 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen in 900 µl DMEM gegeben. Das entspricht einer Endkonzentration von 100 nM siRNA. Die Zellen wurden dann 48 bzw. 72 h mit dem Transfektionsansatz im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.4.2 Transfektion mit Elektroporation

Alternativ wurden die primären humanen Hepatozyten mit dem Maushepatozyten Nucleofector Kit von Lonza elektroporiert. Für einen Transfektionsansatz wurden 2×10^6 Zellen in 81,8 µl Nucleofector Solution, 18,2 µl Nucleofector Supplement 1 und 3 µg siRNA resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in einer Kuvette im Nucleofector I von Lonza mit dem Programm T 16 elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in DULBECCO'S MEM (DMEM) Hoch-Glucose Medium unter Zusatz von 4 ng/ml Hydrokortison, 1,67 mU/ml

Insulin, 2 mM Glutamin, 10% FCS, 1,5% DMSO, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) auf einer 6-Loch Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium durch DULBECCO'S MEM (DMEM) Hoch-Glucose unter Zusatz von 4 ng/ml Hydrocortison, 1,67 mU/ml Insulin, 2 mM Glutamin, 5% FCS, Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) ersetzt und die Zellen weitere 48 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Präparation von Proteinextrakten

2.2.4.1.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Säugerzellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der Zellüberstand wurde abgezogen, die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und einmal mit PBS gewaschen, dann wurde das Zellpellet im gleichem Volumen eiskalten RIPA-Zelllysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die genomische DNA im Zelllysat mit Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.1.2 Präparation von Kernextrakten

Bei der Isolierung von Kernextrakten aus humanen Zellen wurden alle Zentrifugations- und Arbeitsschritte bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Alle Puffer wurden auf Eis vorgekühlt.

Zunächst wurden die adhärenen Zellen im Medium abgeschabt und dann abzentrifugiert (289 g, 10 min). Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (289 g, 10 min). Im Anschluß wurde das Pellet zweimal mit je 5 ml hypertonischem Waschpuffer resuspendiert und zentrifugiert (289 g, 10 min). Der hypertonische Waschpuffer hat ein niedrigeres Ionenpotential als das Zellinnere. Die Zelle nimmt daher osmotisch Wasser auf, bis sie schließlich platzt. Das Pellet der somit aufgeschlossenen Zellen wurde in 1 ml hypertonischem Waschpuffer aufgenommen und dann wiederum abzentrifugiert (15700 g, 1 min). Danach wurde das Pellet in 60 µl Waschpuffer mit Igepal resuspendiert und 5 min inkubiert. Während dieses Vorgangs löst das Detergenz Igepal große Membranbestandteile, wie zum Beispiel das endoplasmatische Reticulum und die Plasmamembran auf. Beim anschließenden Zentrifugationsschritt (15700 g, 15 min) verbleiben diese dann im Überstand,

während das Pellet nun ausschließlich aus Kernen bestand. Das Kernpellet wurde dann in 75 µl Lysepuffer aufgenommen und 15 min auf dem Schüttler Typ VX 2E von Janke und Kunkel inkubiert. Der Lysepuffer baut die Kernmembran in kürzere Membranfragmente ab. Daraufhin wurde noch einmal zentrifugiert (15700 g, 15 min), wobei die Kernmembranfragmente ins Pellet geraten und die Kernproteine im Überstand verbleiben. Der Überstand wurde abgenommen und mit 125 µl Aufbewahrungspuffer vermischt. Zum Schluß wurden die Kernproteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode bestimmt [65]. 200 µl einer 1:50-Mischung von 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure wurden mit 10 µl einer 1:10-Verdünnung der Probe in PBS versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine reduzieren die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen, die mit der Bicinchoninsäure unter Bildung eines violetten BCA- Cu^{1+} -Komplexes weiterreagieren. Dieser Farbkomplex zeigt bei einer Wellenlänge von 562 nm eine starke Absorption und kann photometrisch nachgewiesen werden. Da die Produktbildung proportional zur Proteinmenge ist, konnte über eine BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proben werden vor der Elektrophorese in einem Probenpuffer aufgekocht, der SDS und β -Mercaptoethanol enthält. Die Proteine werden unter diesen Bedingungen denaturiert. Gleichzeitig lagern sich die negativ geladenen SDS-Moleküle gleichmäßig an den aufgefalteten Proteinen an, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und die Polypeptidketten eine konstant negative Ladung pro Masseneinheit erhalten. Die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld erfolgt daher ausschließlich in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Polyacrylamidgels.

Die SDS-Polyacrylamidgele, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10 bzw. 15%igen Trenngel. Die Gellösungen wurden mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED vermischt, die die radikalische Polymerisation des Acrylamids auslösen, und nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen: zuerst unten

das engmaschige Trenngel, das der Auftrennung der Proteine diente, und darauf das großporige Sammelgel mit den Taschen, in dem die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel aufkonzentriert wurden. Nachdem die Acrylamidlösungen vollständig auspolymerisiert waren, wurden die Gele in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 60°C erhitzt (beim Anti-Human AdipoR2 polyklonaler AK (Kaninchen) von IBL) bzw. 5min bei 95°C aufgekocht und in die Taschen gefüllt. Neben den Proben wurde auf das Gel auch ein Proteinstandard, der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, aufgetragen, mit dem die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophorese wurde ca. 70 min bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.4.4 Western-Blotting

Als Western-Blotting wird der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran und deren anschließende immunchemische Detektion auf der Membran bezeichnet [63].

In dieser Arbeit wurde für den Proteintransfer das Wettransfer-Verfahren verwendet, d.h. der Elektrotransfer wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer durchgeführt. Die für den Blot benötigten Schwämmchen und Filterkartons, sowie das SDS-Acrylamidgel und die Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulosemembran (BIORAD) wurden kurz in Wettransferpuffer äquilibriert. Die Immun-Blot™ PVDF Membran (BIORAD) musste vor der Äquilibration kurz mit Methanol benetzt werden. Der Blot wurde dann wie folgt aufgebaut: zuerst ein Schwämmchen, dann zwei Filterpapiere, darauf die Nitrocellulose oder die PVDF Membran und das Gel, gefolgt von zwei weiteren Filterpapieren und dem zweiten Schwämmchen. Mit einer Pipette wurde mehrmals über dieses Blot-Sandwich gerollt, um Luftblasen zu entfernen. Das Sandwich wurde dann in eine Kassette eingespannt und so in die Blot-Apparatur gesetzt, dass die Membran zur Anode orientiert war. Die Kammer wurde mit Wettransferpuffer gefüllt, bis der Blot gut bedeckt war. Ein zusätzlich eingesetzter Eisblock sorgte für die Kühlung des Puffers während des Transfers. Anschließend wurden die Proteine 90 min bei einer konstanten Spannung von 80 V auf die Membran übertragen.

Nach dem Transfer erfolgte die Detektion der auf der Membran immobilisierten Proteine über eine Antikörper-gekoppelte Chemilumineszenzreaktion. Hierfür wurde die Membran zunächst eine Stunde in Blockierlösung P geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken,

anschließend dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit primären Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das Protein und wurde meist im Verhältnis 1:1000 in BSA-PBST oder BSA-TBST verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran noch eine Stunde bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, bevor durch dreimaliges Waschen mit PBST bzw. TBST unspezifisch gebundene Antikörper entfernt wurden und die Membran eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 in der jeweiligen Blockierlösung verdünnt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zuerst eine Stunde mit PBST bzw. TBST und dann einmal kurz mit PBS bzw. TBS gewaschen. Anschließend wurde die Detektion der HRP mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die beiden Lösungen des ECL-Systems wurden laut Packungsangabe miteinander vermischt, die Membran mit 1 ml dieser Mischung bedeckt und 5 min bei RT inkubiert. Von der HRP wird in der ECL-Lösung eine Reaktion katalysiert, die zur Freisetzung einer Chemilumineszenz führt. Die Lichtsignale können mit einem Autoradiographiefilm detektiert werden. Hierzu wurde die Membran in einer Klarsichtfolie in eine Filmkassette gelegt und ein Hyperfilm ECLTM je nach Intensität des Signals für wenige Sekunden oder bis zu 60 min aufgelegt. Nach dem Entwickeln des Films war das über den Antikörper nachgewiesene Protein als dunkle Bande auf dem Film zu erkennen.

2.2.4.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Nachweisprinzip des ELISAs beruht, analog zum Western Blotting, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (Capture AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (Detection AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, dass ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Diese Art des ELISA wird als Sandwich-ELISA bezeichnet. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch nachgewiesen werden. Über eine Standardkurve läßt sich somit die Proteinkonzentration der Proben berechnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DuoSet® ELISA Development System Kits von R&D Systems zur Quantifizierung von Chemerin und Activin A in Zellüberständen, sowie der DuoSet® ELISA Development System Kit von R&D Systems zur Quantifizierung von TGF- β 1 in Seren und Zellüberständen verwendet. Eine 96-Loch-Platte wurde zunächst über Nacht mit in PBS gelöstem Capture AK inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit Reagent Diluent (für Activin A und Chemerin) bzw. Blocking Buffer (für TGF- β 1) 1 h blockiert. Die Platte wurde ein weiteres Mal gewaschen, und dann über Nacht bei 4°C (Activin A) oder 2 h bei Raumtemperatur (Chemerin und TGF- β 1) mit den Proben und dem Standard inkubiert. Für den Leerwert wurde Reagent Diluent verwendet, mit dem auch der Standard verdünnt wurde. Die Proben für die Messung von TGF- β 1 wurden vorbehandelt, um latentes TGF- β 1 von seinen Bindeproteinen zu lösen. Dazu wurden zu 200 μ l Zellüberstand 40 μ l 1 N HCl gegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 40 μ l 1.2 N NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert. 100 μ l einer 1:10 Verdünnung von Serum wurden zunächst mit 100 μ l 2,5 N Essigsäure/10 M Harnstoff versetzt und nach 10 minütiger Inkubation bei RT 100 μ l 2,7 N NaOH/1 M HEPES zugegeben. Die Proben wurden unverdünnt für die Messung von Activin A, 1:16 verdünnt für die Messung von Chemerin, 1:1,4 verdünnt für die Messung von TGF- β 1 in Zellüberständen und 1:30 verdünnt für die Messung von TGF- β 1 in Seren eingesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Platte 2 h mit dem biotinylierten Detection AK inkubiert. Die Platte wurde noch einmal gewaschen und dann für 20 min mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat inkubiert, das über Streptavidin spezifisch an das Biotin des Detection AK bindet. Dann wurde eine Substratlösung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin zugefügt, in der die HRP die Bildung eines blauen Farbstoffes katalysiert. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendet, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlug. Die Intensität der gelben Färbung wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen das unspezifische Hintergrundsignal bei einer Wellenlänge von 540 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

Für die Quantifizierung von Follistatin in Zellüberständen von primären Hepatozyten wurden der Quantikine Human Follistatin Immunoassay Kit von R & D Systems verwendet. Die Proben wurden dazu unverdünnt und über Nacht bei 4°C aufgetragen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4.6 Gelatine Zymographie

Bei der Gelatine Zymography wird die Aktivität der Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 bestimmt.

Dazu wurden Gewebelysate, die in nicht reduzierendem Zymographie Lysepuffer homogenisiert wurden oder Zellüberstände im Verhältnis 1:2 mit Zymographie Probenpuffer vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben auf ein Gelatinehaltigem Gel aufgetragen und die Proteine 120 min bei 120 V und 4°C in SDS Laufpuffer der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 2 x 15 min in Renaturierungspuffer bei RT geschwenkt. Dabei können sich die Matrix Metalloproteinasen, die bei der SDS-Gelelektrophorese denaturiert wurden in ihren aktiven Zustand zurückfalten. Das Gel wurde dann 48 h bei 37°C in Entwicklungspuffer gelegt. Während dieser Zeit bauen die Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 die Gelatine im Gel ab. Bei der anschließenden Coomassie Färbung des Gels bleibt der Bereich an dem dieser Abbau stattgefunden hat weiß.

2.2.5 Extraktion von Lipiden

Lipide wurden im Rahmen dieser Arbeit aus Lebergewebe, Fettgewebe und primären humanen Hepatozyten, die vorher in Zellkultur genommen wurden, isoliert. Zur Isolation der Lipide aus Gewebe wurde 50 mg Fett- oder Lebergewebe abgewogen, mit dem Mörser auf Trockeneis pulverisiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 1 ml Chloroform/ Methanol (2:1 Mischung) aufgenommen. Zur Isolation der Lipide aus primären Hepatozyten in Zellkultur wurden die Zellen nach dem Abschaben und pelletieren in 500 µl Chloroform/ Methanol (2:1 Mischung) aufgenommen. Anschließend wurden die Ansätze 1 h bei RT geschüttelt. Während dieser Zeit lösen sich die Lipide aus den Zellen und dem Gewebe in der Chloroform/Methanol Mischung. Danach wurde Wasser im Verhältnis 1:5 zugegeben und der Ansatz nach vortexen 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bildet sich oben eine polare Phase in der sich Nukleinsäuren, Proteine und Zell- und Gewebereste befinden. In der unteren unpolaren Phase sind die Lipide gelöst. Die untere Phase wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Ansatz über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Lipide in einer Mischung aus 60 µl tert-Butanol und 40 µl Triton X-114/Methanol (2:1 Mischung) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.6 Statistische Auswertungen

Statistische Unterschiede wurden mit Student's t-test oder Mann-Whitney U Test berechnet, und ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Adiponectin und seine Rezeptoren in der hepatischen Steatose

3.1.1 Adiponectinmenge im Serum bei NAFLD

Die Konzentration von Adiponectin wurde im Serum von Patienten mit Fettleber und in Mausmodellen für NASH und Fibrose gemessen. Verminderte Serumkonzentration von Adiponectin in der hepatischen Steatose, der NASH oder der Fibrose könnten auf eine gestörte Aktivität des Adipokins in der NAFLD hinweisen. Zudem könnte Adiponectin möglicherweise als Serummarker für eine progressive NASH genutzt werden.

3.1.1.1 Adiponectin ist im Serum von Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber erniedrigt

Adiponectin wurde im Serum von Patienten mit und ohne Fettleber gemessen (Abb. 6). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kontrollpersonen sich im Body Mass Index (BMI) nicht signifikant von den Fettleberpatienten unterschieden. Außerdem wurden nur Patienten zur Messung herangezogen, die geringe Mengen oder keinen Alkohol konsumierten und auch keine anderen Leberkrankheiten aufwiesen, um sicher zu gehen, dass es sich bei diesen um eine Nicht-alkoholische Fettleber handelt (Tabelle 2).

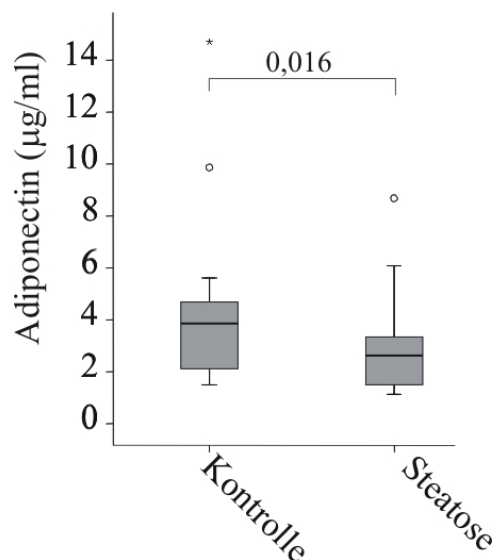


Abbildung 6: Serumkonzentration von Adiponectin in humanen Spendern mit (Steatose; 18 Personen) und ohne (Kontrolle; 18 Personen) sonographisch diagnostizierter Fettleber. Für die Auswertung wurden die Personen nach dem BMI abgeglichen.

Die Adiponectinserumkonzentration war in den Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber signifikant geringer ($p=0,016$) als in den Kontrollpatienten (Abbildung 6).

3.1.1.2 Adiponectin ist im Serum bei Mäusen auf Paigendiät erniedrigt

Zur Untersuchung der Adiponectinserumkonzentration in der NASH wurde ein Mausmodell herangezogen. Dazu wurden weibliche C57/Bl6 Mäuse sechs Monate mit der Paigendiät, die einen Fettanteil von 17%, 25% oder 35% enthielt, oder mit Standarddiät gefüttert. Die Mäuse auf Paigendiät hatten ein signifikant erhöhtes Körper- und Lebergewicht. Der prozentuale Anteil des Lebergewichts am Gesamtgewicht der Mäuse war bei den Mäusen die mit

Paigendiät gefüttert wurden ebenfalls signifikant erhöht gegenüber den Mäusen, die mit Standarddiät gefüttert wurden (Kontrollen: $4,5 \pm 0,4$ %; Paigen + 17% Fett: $12,9 \pm 2,8$ %, $p=0,0003$ gegenüber den Kontrolltieren; Paigen + 25% Fett: $8,3 \pm 0,6$ %, $p=0,00001$ gegenüber den Kontrolltieren; Paigen + 35% Fett: $9,2 \pm 1,0$ %, $p=0,0009$ gegenüber den Kontrolltieren).

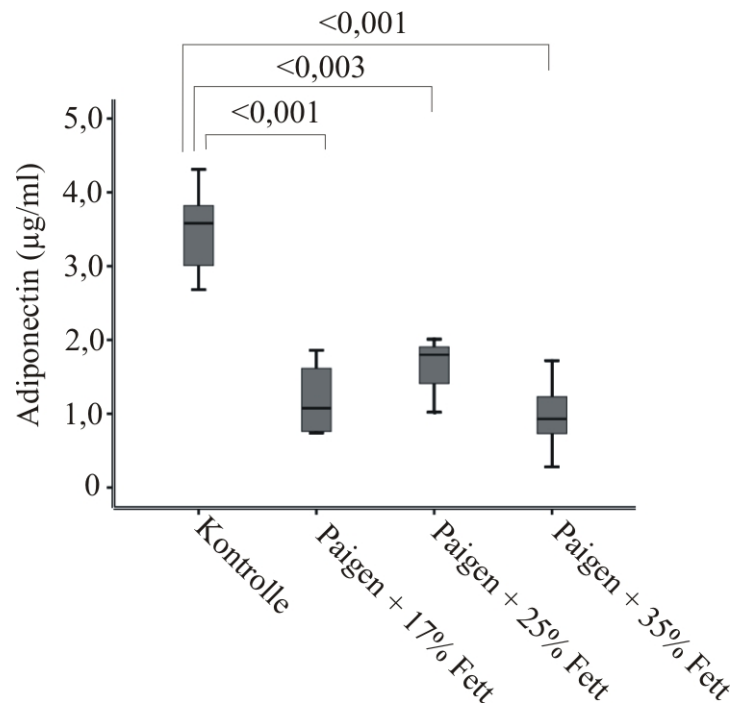


Abbildung 7: Serumkonzentration von Adiponectin in Mäusen, die sechs Monate auf Paigen Diät mit unterschiedlichem Fettanteil oder auf Standarddiät (Kontrolle) gehalten wurden (sechs Tiere pro Gruppe).

Die Adiponectinserumkonzentration war in den Mäusen, die mit Paigendiät gefüttert wurden signifikant geringer als in den Mäusen, die mit Standarddiät gefüttert wurden. Die Erhöhung des Fettanteils in der Paigendiät führte zu keiner vermehrten Gewichtszunahme (nicht dargestellt) und keiner weiteren Reduzierung der Adiponectinserumkonzentrationen (Abbildung 7)

3.1.2 Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in der Leber bei NAFLD

Die Expression der beiden Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 wurde in der Leber von Patienten mit Fettleber und NASH und in Tiermodellen für Fettleber, NASH und Fibrose untersucht. Eine veränderte Expression der Rezeptoren in der NAFLD könnte einen Hinweis auf einen Zusammenhang der Leberschädigung mit dem Adiponectinsignalweg in der Leber geben.

3.1.2.1 Die AdipoR1 und AdipoR2 mRNA ist in der Leber von Patienten mit NAFLD und NASH unverändert

Die mRNA Menge der Adiponectinrezeptoren von Patienten bei denen eine Fettleber oder eine NASH diagnostiziert wurde, wurde mit derer von Patienten verglichen, die keinen Leberschaden aufwiesen. Dazu wurde die RNA aus einer Leberbiopsie dieser Spender isoliert.

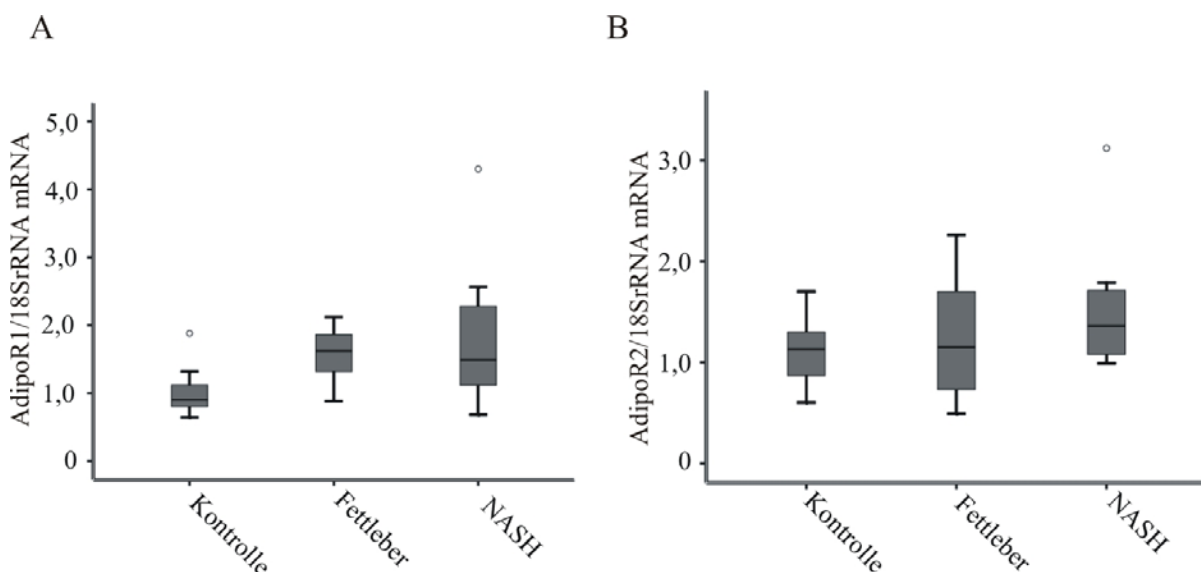


Abbildung 8: (A) Hepatische AdipoR1 und (B) AdipoR2 mRNA von Spendern ohne Leberverfettung (Kontrolle; 9 Personen), mit Fettleber (Fettleber; 9 Personen) und mit fibrotischer Leber (NASH; 8 Personen) normalisiert gegen 18SrRNA.

Die mRNA Menge der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 war in der Leber von NAFLD Patienten im Vergleich zu Patienten ohne Leberschaden unverändert (Abbildung 8).

3.1.2.2 AdipoR2 Protein, nicht jedoch AdipoR1 Protein ist in der Leber von Patienten mit Fettleber reduziert

Die AdipoR1 und AdipoR2 Proteine wurden mit Immunoblot in Leberlysaten der Patienten mit und ohne Fettleber bestimmt (Tabelle 1). Die Patienten konsumierten nur sehr wenig oder keinen Alkohol, so dass man davon ausgehen konnte, dass es sich bei den Fettleberpatienten um Nicht-alkoholische Fettlebern handelte.

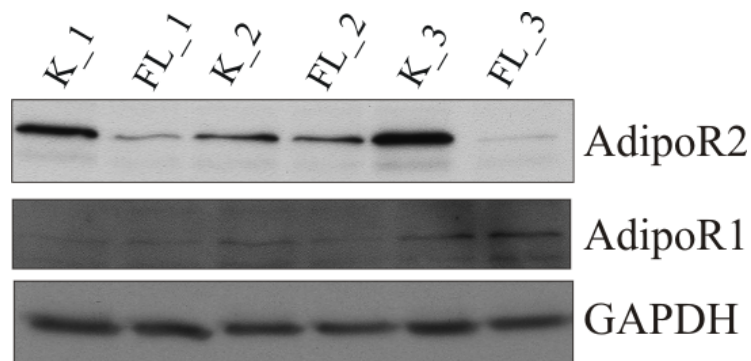


Abbildung 9: AdipoR1 und AdipoR2 Proteinmenge in Patienten mit (FL) und ohne (K) Fettleber. Die GAPDH Proteinmenge wurde zur Beladungskontrolle bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von insgesamt jeweils 7 untersuchten Spendern mit und ohne Fettleber.

Die hepatische AdipoR2 Proteinmenge war in Patienten mit Fettleber reduziert, die AdipoR1 Proteinmenge war unverändert (Abbildung 9). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der Fettleber die über AdipoR2 vermittelten Adiponectineffekte reduziert sind.

3.1.2.3 Die Adiponectinrezeptoren sind in der Leber von Mäusen auf Paigendiät und Ratten auf Hochfettdiät unverändert

In weiblichen C57/Bl6 Mäusen, die 16 Wochen mit Paigendiät gefüttert wurden und männlichen Wistar Ratten, die 8 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden, wurde die Proteinmenge der Adiponectinrezeptoren bestimmt und mit der Proteinmenge der Rezeptoren bei Mäusen die mit einer Standarddiät gefüttert wurden verglichen. Die Mäuse, die mit Paigendiät gefüttert wurden hatten ein signifikant erhöhtes Körper- und Lebergewicht gegenüber den Mäusen, die mit Standarddiät gefüttert wurden. Bei den Paigenmäusen war der prozentuale Anteil des Lebergewichts am Gesamtkörpergewicht ebenfalls signifikant erhöht (Kontrollmäuse: $4,3 \pm 0,12$ %, Paigenmäuse: $7,4 \pm 0,59$ %; $p = 0,0001$).

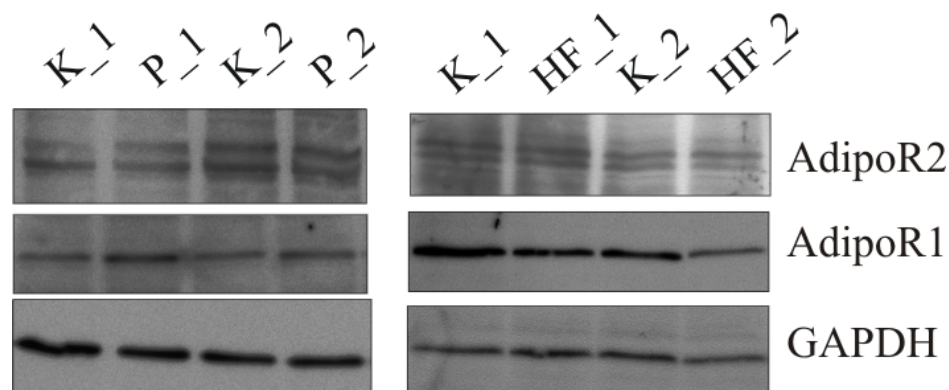


Abbildung 10: AdipoR1, AdipoR2 und GAPDH Proteinmenge in der Leber von Mäusen auf Paigendiät (P) bzw. Standarddiät als Kontrolle (K) und in Ratten auf Hochfettdiät (HF) bzw. Standarddiät als Kontrolle (K). Repräsentativer Western Blot von jeweils sechs untersuchten Mäusen auf Standard- und Paigendiät und jeweils sechs Ratten auf Standard- und Hochfettdiät.

Die Proteinmenge von AdipoR1 und AdipoR2 nach Paigendiät bei Mäusen und nach Hochfettdiät bei Ratten war im Vergleich zu den mit Standarddiät gefütterten Tieren in der Leber unverändert (Abbildung 10).

3.1.3 Primäre humane Hepatozyten akkumulieren Triglyzeride nach Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure

In der humanen Fettleber ist die Einlagerung von Triglyzeriden erhöht. Eine mögliche Ursache sind erhöhte freie Fettsäuren im Serum bzw. Pfortaderblut, die dann verstärkt als Triglyzeride gespeichert werden [2]. Hepatozyten können freie Fettsäuren durch Diffusion über die Plasmamembran und mit Hilfe von Fettsäuretransportern wie CD36 aufnehmen und als Triglyzeride in Lipidtropfen speichern [66].

Zur Simulation dieses Zustandes in-vitro wurden primäre humane Hepatozyten nach der Isolation aus gesundem Lebergewebe auf Zellkulturplatten ausgebracht und mit Palmitin- und Ölsäure inkubiert. Um zu überprüfen, ob die Zellen die Fettsäuren aufnehmen und intrazellulär in Form von Triglyzeriden speichern, wurde die Konzentration der Triglyzeride nach Extraktion der Lipide aus dem Zelllysats in diesen Zellen und in Kontroll-inkubierten Zellen gemessen.

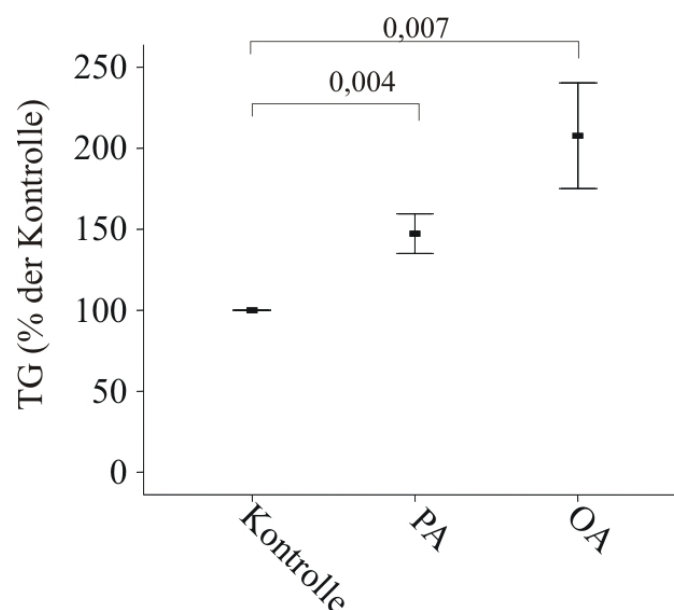


Abbildung 11: Triglyzeride (TG) im Zelllysats von primären humanen Hepatozyten nach 24 h Inkubation mit 0,3 mM Palmitin (PA)- und Ölsäure (OA) komplexiert mit BSA oder einer BSA-Lösung als Kontrolle. Das Ergebnis wurde normalisiert gegen Gesamtzellprotein. Es wurden Daten von Hepatozyten isoliert aus 3 verschiedenen Spendern ausgewertet.

Die Zellen, die mit Palmitin- und Ölsäure inkubiert wurden, wiesen eine signifikant höhere Menge an Triglyzeriden auf als die Kontroll-inkubierten Zellen (Abbildung 11).

3.1.4 Die Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure führt zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate, hat aber keinen Einfluss auf die Nekroserate der Hepatozyten

Um festzustellen ob die Inkubation der Hepatozyten mit Palmitin- und Ölsäure einen negativen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat wurde als Maß für die Apoptoserate im Zelllysats die Proteinmenge von full length Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und seinen Spaltprodukten bestimmt. Als Maß für die Nekroserate dieser Zellen wurde die Aktivität der Laktat Dehydrogenase (LDH) im Überstand gemessen. Die LDH wird bei der Lyse der nekrotischen Zellen in den Überstand freigesetzt.

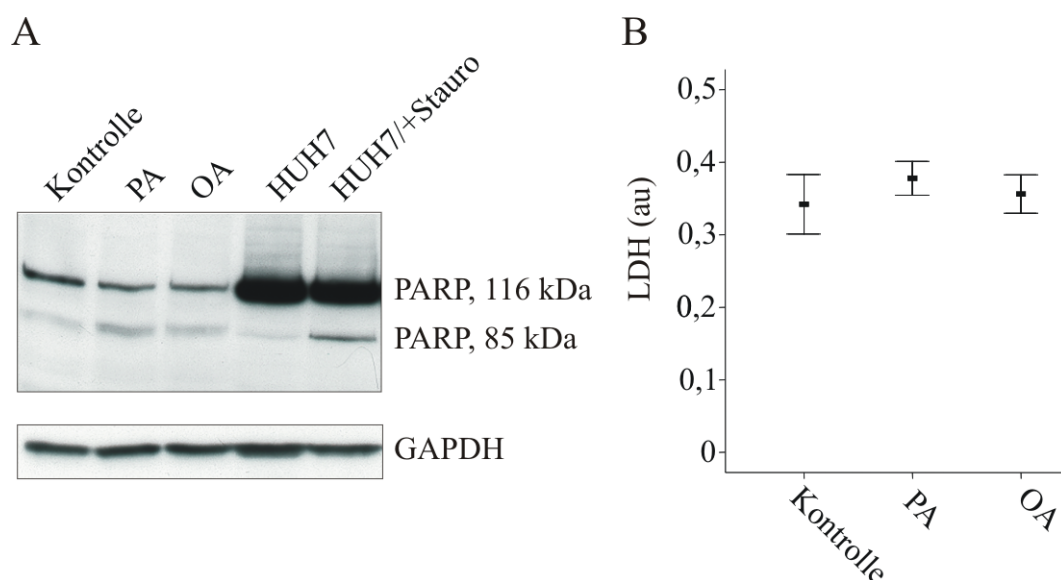


Abbildung 12: (A) Proteinmenge von full length PARP, des 85 kDa PARP Spaltproduktes und GAPDH als Beladungskontrolle in primären humanen Hepatozyten (repräsentativer Blot von insgesamt drei unabhängigen Versuchen) die für 24 h mit 0,3 mM Palmitin (PA)- und Ölsäure (OA) bzw. einer BSA-Lösung als Kontrolle inkubiert wurden. Als positive Kontrolle wurden HUH7 Zellen und HUH7 Zellen, die zur Induktion der Apoptose mit Staurosporin inkubiert wurden, verwendet. (B) Aktivität der LDH in den Überständen der mit Palmitin- und Ölsäure inkubierten Zellen.

Die Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure führte zu einer geringfügig vermehrten Spaltung von full length PARP. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant wenn die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche ausgewertet wurden (Abbildung 12A). Die LDH Konzentration war in den Überständen der Kontroll-inkubierten und der Fettsäure-inkubierten Zellen unverändert (Abbildung 12B). Palmitin- und Ölsäure haben also keinen Einfluss auf die Nekroserate in primären humanen Hepatozyten.

3.1.5 Einfluss von Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin auf die Expression der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in primären humanen Hepatozyten

Fettsäuren können die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie Peroxisome Proliferated Activated Receptor (PPAR), Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4), Nuclear Factor – κ B, SREBP und Liver X Receptor (LXR) durch direkte Bindung an diese Proteine verändern. Außerdem können Fettsäuren die Fluidität und die Zusammensetzung von Lipid rafts verändern und dadurch die Signaltransduktion über G Protein gekoppelte Rezeptoren oder Tyrosinkinase Rezeptoren beeinflussen [67].

3.1.5.1 Die Inkubation von Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin hat keinen Einfluss auf die mRNA Expression von AdipoR1 und AdipoR2

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin stimuliert und die mRNA Expression der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 bestimmt.

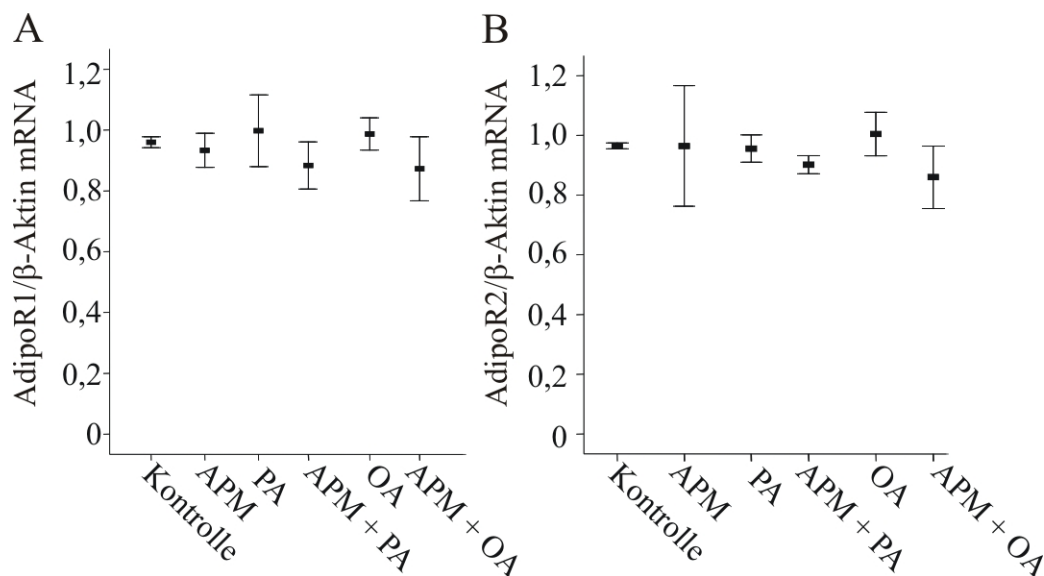


Abbildung 13: (A) AdipoR1 und (B) AdipoR2 mRNA Menge in primären humanen Hepatozyten inkubiert mit 0,3 mM Palmitinsäure (PA), 0,3 mM Ölsäure (OA), 10 μ g/ml Adiponectin (APM), PA und APM zusammen, OA und APM zusammen oder PBS als Kontrolle normalisiert gegen β -Aktin als Haushaltsgen. Die Auswertung von insgesamt drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

Weder die Stimulation mit den Fettsäuren noch die Inkubation mit Adiponectin alleine bzw. in Kombination veränderte die mRNA Menge der Adiponectinrezeptoren in den Zellen. (Abbildung 13).

3.1.5.2 Die Inkubation von primären Hepatozyten mit Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge der Adiponectinrezeptoren

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Palmitin-, Ölsäure und Adiponectin stimuliert und die AdipoR1 und AdipoR2 Proteinmenge im Gesamtzellextrakt bestimmt.

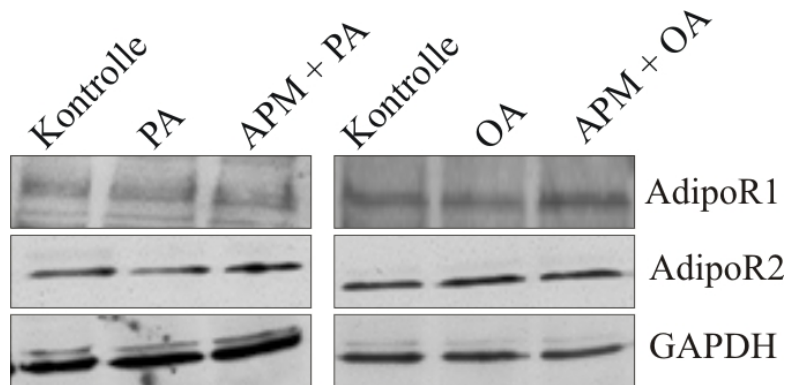


Abbildung 14: AdipoR1, AdipoR2 und GAPDH Proteinmenge in primären humanen Hepatozyten, die für 24 h mit 0,3 mM Palmitinsäure (PA), 0,3mM Ölsäure (OA), 0,3 mM Palmitinsäure und 10 µg/ml Adiponectin (PA + APM), 0,3 mM Ölsäure und 10 µg/ml Adiponectin (OA + APM) bzw. einer BSA Lösung als Kontrolle inkubiert wurden. Ein repräsentativer Western Blot von insgesamt drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Weder die Stimulation mit den Fettsäuren noch die Inkubation mit Adiponectin veränderte die Proteinmenge der Adiponectinrezeptoren in den Zellen. Auch die Kostimulation mit Adiponectin in Gegenwart von Palmitin- bzw. Ölsäure hatte keinen Einfluss auf AdipoR1 und AdipoR2 (Abbildung 14).

3.2 Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten und verfetteten Hepatozyten

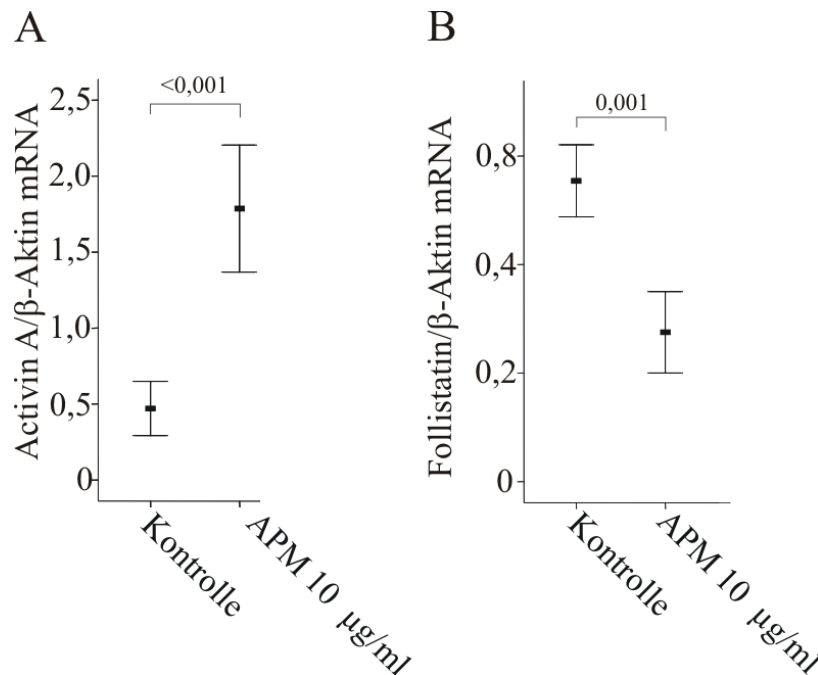
In der Fettleber sind es vor allem die Hepatozyten, die Triglyzeride in Lipidtropfen anreichern. Wie in Abbildung 11 gezeigt reichern primäre humane Hepatozyten nach Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure intrazellulär Triglyzeride an. Zur Erzeugung eines in-vitro Modells eines Hepatozyten im Zustand der Fettleber wurden primäre humane Hepatozyten 24 h mit Palmitin- und Ölsäure verfettet.

3.2.1 Einfluss von Adiponectin auf Activin A-, Follistatin- und TGF- β - in Hepatozyten

TGF- β und Activin A gehören zur TGF- β Superfamilie von Proteinen. Follistatin bindet an Activin A und verhindert so dessen Bindung an den Rezeptor [14-15]. Wie im Abschnitt 1.3 beschrieben spielen diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Progression der NAFLD. Im folgenden Abschnitt wurde untersucht welchen Effekt Adiponectin auf die Produktion dieser Moleküle in Hepatozyten hat und ob sich daraus auf eine Rolle dieses Adipokins bei der NAFLD schließen lässt.

3.2.1.1 Adiponectin induziert die Activin A mRNA und reprimiert die Follistatin mRNA in primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin inkubiert und der Effekt dieser Stimulation auf die Activin A und Follistatin mRNA Menge mit Real Time RT-PCR im Light Cyclers untersucht.



Abbildungen 15: (A) Activin A und (B) Follistatin mRNA Menge in primären humanen Hepatozyten, die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin (APM) oder PBS als Kontrolle inkubiert wurden, normalisiert gegen β -Aktin mRNA als Haushaltsgen. Die Auswertung von vier unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Adiponectin induzierte signifikant die Activin A mRNA und reduzierte signifikant die Follistatin mRNA in primären humanen Hepatozyten (Abbildung 15).

3.2.1.2 Adiponectin erhöht die Activin A zu Follistatin Rate im Überstand von primären humanen Hepatozyten

Activin A und Follistatin werden von den Hepatozyten sezerniert. Entscheidend für die biologische Wirkung von Activin A ist das Verhältnis des Proteins zu seinem Inhibitor Follistatin im extrazellulären Raum. Um einen Hinweis darauf zu bekommen welchen Einfluss Adiponectin auf die Activin A Wirkung haben könnte wurde der Effekt von

Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate im Überstand von primären humanen Hepatozyten untersucht.

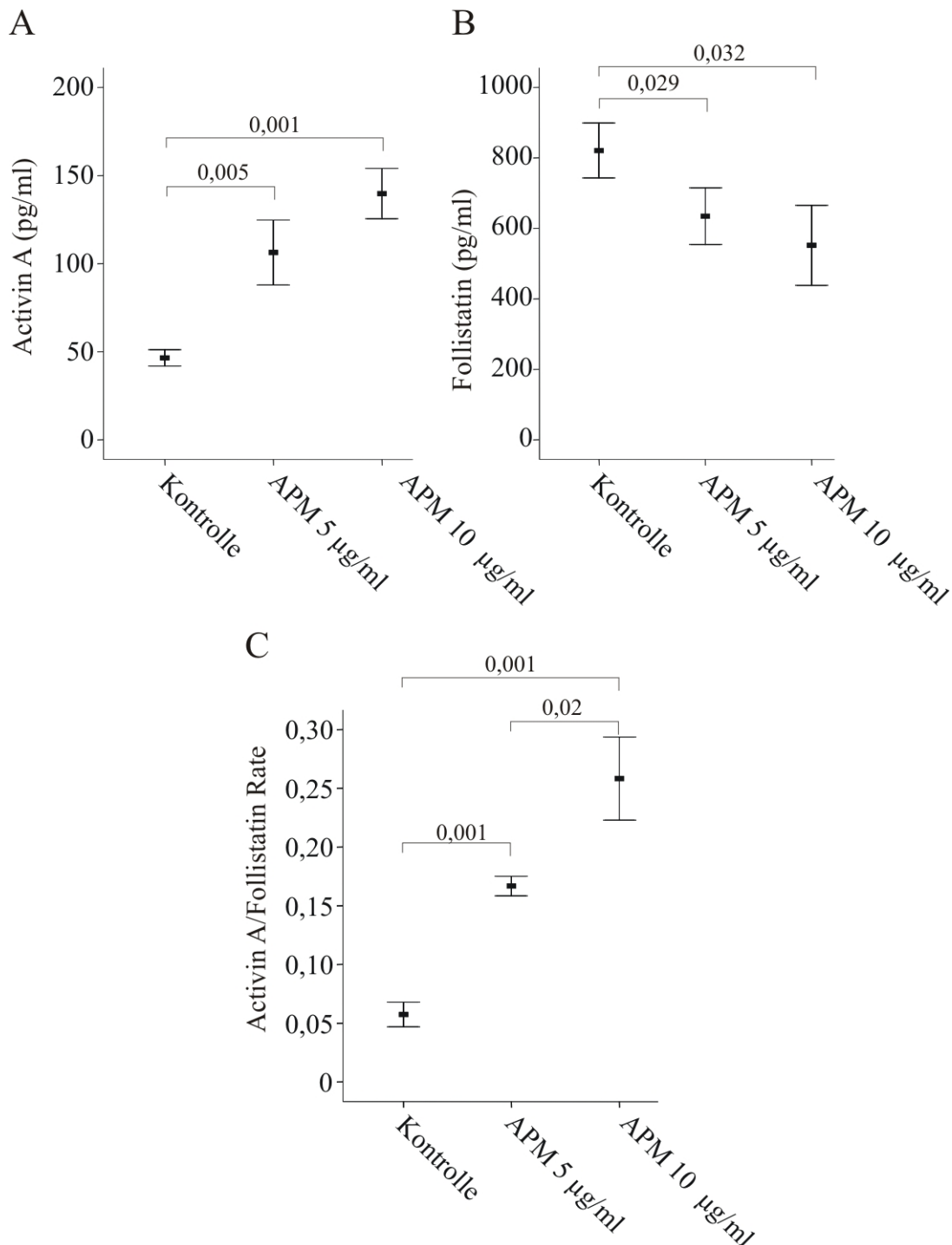


Abbildung 16: (A) Activin A und (B) Follistatin Proteinkonzentration im Überstand von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 4 Spendern wurden untersucht) inkubiert für 24 h mit 5 bzw. 10 µg/ml Adiponectin (APM) bzw. PBS als Kontrolle. Die Messung erfolgte mit ELISA. (C) Berechnung der Activin A zu Follistatin Rate aus den Ergebnissen in A und B.

Adiponectin erhöhte signifikant die Activin A Proteinmenge (Abbildung 16A) und senkte signifikant die Follistatin Proteinmenge (Abbildung 16B) im Überstand der primären Hepatozyten. Daraus ergibt sich, dass die Activin A zu Follistatin Rate im Überstand der Zellen nach Adiponectinstimulation signifikant erhöht war. Bei einer Adiponectinkonzentration von 10 µg/ml war die Activin A zu Follistatin Rate nochmals signifikant erhöht gegenüber einer Stimulationskonzentration von 5 µg/ml (Abbildung 16C). Die Tatsache, dass der Effekt von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate dosisabhängig ist, ist ein klarer Hinweis darauf, dass dieser Effekt Adiponectin-spezifisch ist.

3.2.1.3 Die Activin A zu Follistatin Rate ist im Überstand der hepatozytären Zelllinien HepG2, Hep3B, PLC, HUH7 und NeHepLxHT im Vergleich zu primären Hepatozyten erniedrigt

Zellen, die sich zu Karzinomzellen entwickeln, zeichnen sich dadurch aus, dass sie übermäßig proliferieren und immun sind gegen Faktoren, die Apoptose induzieren. In der Regel unterlaufen diese Zellen eine Reihe von Veränderungen, die ihnen einen Selektionsvorteil gegenüber gesunden Zellen bringen. Da hepatozytäre Zelllinien oft für in-vitro Experimente verwendet werden wurde untersucht ob die Synthese von Activin A und Follistatin in den Überständen dieser Zellen mit der Konzentration dieser Proteine im Überstand von primären humanen Hepatozyten vergleichbar ist.

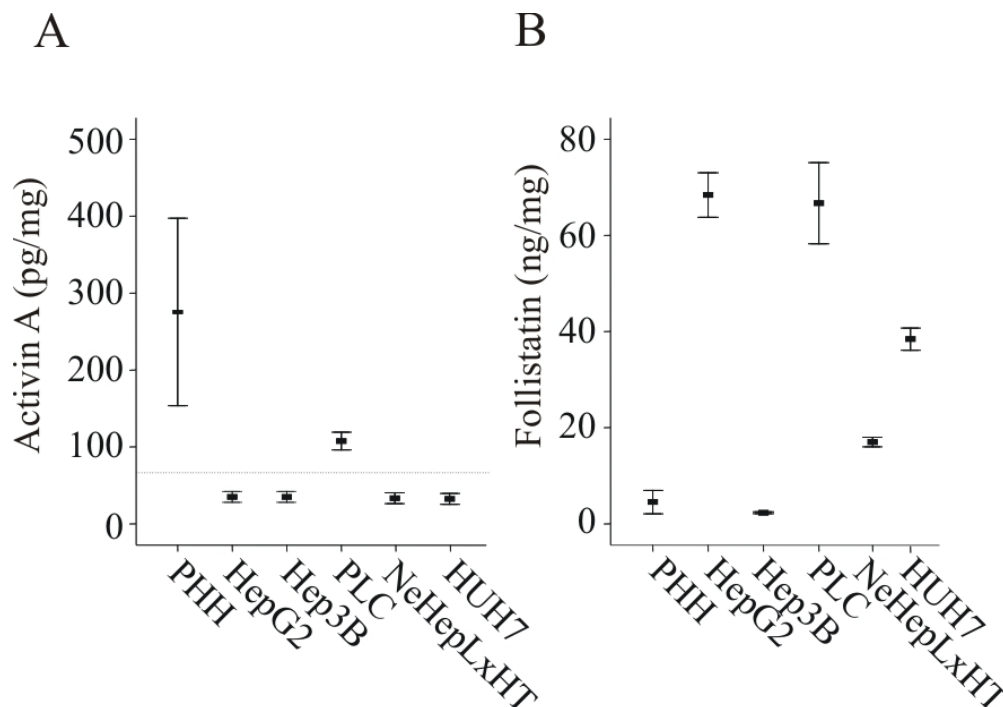


Abbildung 17: (A) Activin A und (B) Follistatin in Überständen von primären humanen Hepatozyten (PHH), humanen hepatozytären Karzinomzelllinien (HepG2, Hep3B, PLC, HUH7) und der Zelllinie NeHepLxHT, die aus immortalisierten neonatalen humanen Hepatozyten durch Transduktion des retroviralen Expressionsvektors pLXSN erzeugt wurde. Die Proteinmenge wurde normalisiert auf das Gesamtzellprotein. Die gestrichelte Linie in A zeigt die Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs an: Die Activin A Konzentration in den Überständen der HepG2, Hep3B, NeHepLxHT und HUH7 lag unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs.

Die Activin A Konzentration war in den hepatozytären Karzinomzelllinien niedriger als in den primären Hepatozyten (Abbildung 17A). Die Follistatin Konzentration war in den Zelllinien HepG2, PLC, HUH7 und NeHepLxHT erhöht und in den Hep3B Zellüberständen

in etwa genauso hoch wie in den primären Zellen (Abbildung 17B). In vier der fünf hepatozytären Karzinomzelllinien war die Activin A zu Follistatin Rate im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten reduziert. Es ist also anzunehmen, dass eine verminderte Activin A Wirkung die Proliferation von hepatischen Tumorzellen fördern könnte.

3.2.1.4 Adiponectin hat keinen Einfluss auf die TGF- β Proteinmenge im Überstand von primären humanen Hepatozyten

Die Hauptproduzenten von TGF- β in der Leber sind die Kupffer Zellen [19]. Aber auch Hepatozyten sezernieren TGF- β in-vitro [68]. Die freigesetzte Menge ist allerdings im Vergleich zur Menge die Kupffer Zellen produzieren sehr gering, so dass anzunehmen ist, dass dieses TGF- β vor allem autokrin wirkt. Im folgenden Versuch wurden primäre humane Hepatozyten mit Adiponectin stimuliert und die TGF- β Konzentration im Zellüberstand gemessen.

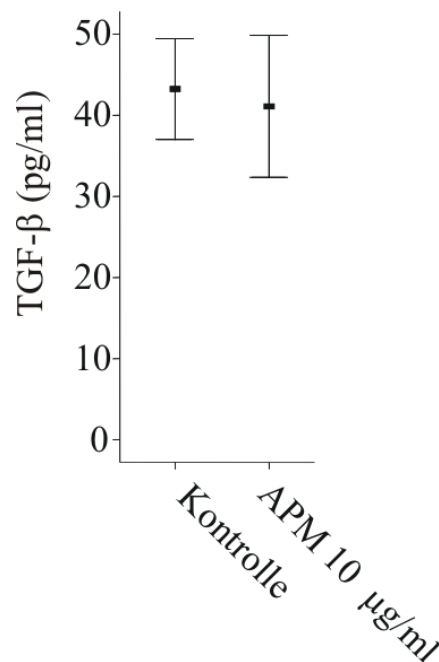


Abbildung 18: TGF- β im Überstand von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 4 Spendern wurden untersucht), die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin (APM) oder PBS als Kontrolle inkubiert wurden.

Adiponectin hatte keinen Einfluss auf die TGF- β Konzentration im Überstand der Hepatozyten (Abbildung 18).

3.2.2 Einfluss von Lipidakkumulation auf die Activin A-, Follistatin- und TGF- β Proteinmenge in Zellkulturüberständen von primären humanen Hepatozyten

Der Triglyzeridgehalt der Zelle kann einen Einfluss darauf haben, wie diese auf bestimmte Signalmoleküle reagiert. So ist beispielsweise der Insulinsignalweg in verfetteten Hepatozyten gestört [69]. Daher sollte geklärt werden ob die Wirkung von Adiponectin in verfetteten Hepatozyten verändert ist.

3.2.2.1 Palmitin- und Ölsäure verhindern den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A ohne die basalen Activin A und Follistatin Spiegel zu verändern

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Palmitin- und Ölsäure verfettet und anschließend mit Adiponectin stimuliert. Die Activin A und Follistatin Konzentration wurde im Überstand der Zellen gemessen.

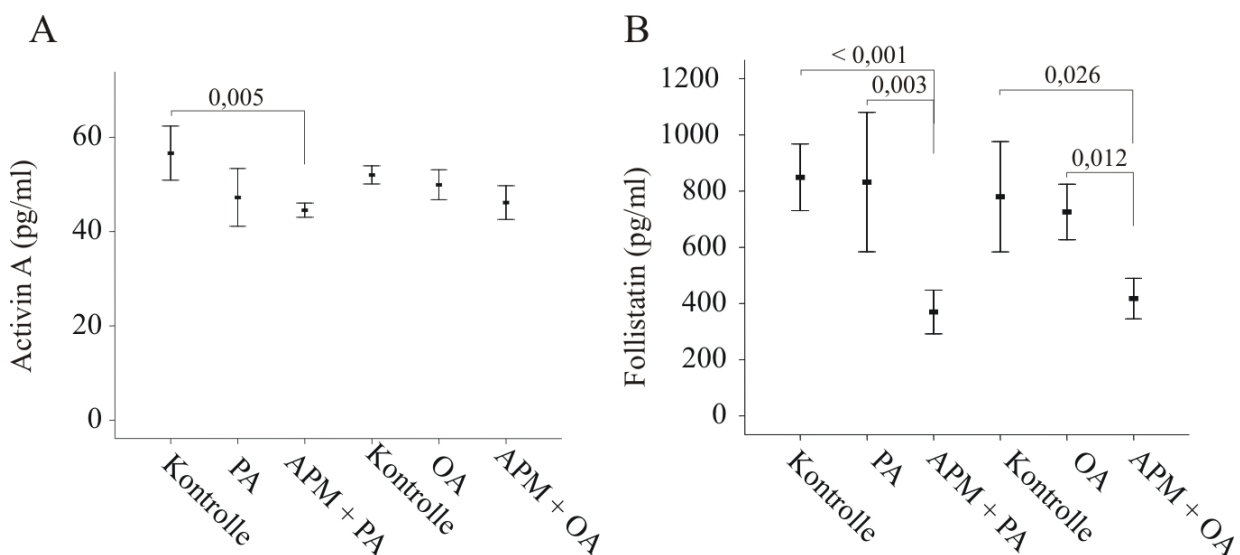


Abbildung 19: (A) Activin A und (B) Follistatin in Überständen von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 3 Spendern wurden untersucht), die 24 h mit 0,3 mM Palmitinsäure (PA), 0,3 mM Ölsäure (OA), 0,3 mM Palmitinsäure und 10 μ g/ml Adiponectin (PA + APM), 0,3 mM Ölsäure und 10 μ g/ml Adiponectin (OA + APM) oder einer BSA Lösung als Kontrolle inkubiert wurden.

Palmitin- und Ölsäure hatten alleine keinen Einfluss auf die Activin A Menge im Überstand der Hepatozyten. Die Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure hatte jedoch zur Folge, dass die Activin A Konzentration im Überstand der mit Adiponectin inkubierten Zellen nicht mehr, signifikant zunahm (Abbildung 19A). Die beiden Fettsäuren hatten für sich ebenfalls keinen Einfluss auf die Follistatin Konzentration im Zellüberstand. Nach Vorinkubation der Hepatozyten mit den Fettsäuren und anschließender Stimulation mit Adiponectin war die

Follistatin Menge im Überstand, ebenso wie in den nicht verfetteten Hepatozyten, signifikant reduziert (Abbildung 19B).

3.2.2.2 Palmitin- und Ölsäure induzieren TGF- β im Überstand von primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Palmitin- und Ölsäure inkubiert und die TGF- β Konzentration im Überstand der Zellen gemessen.

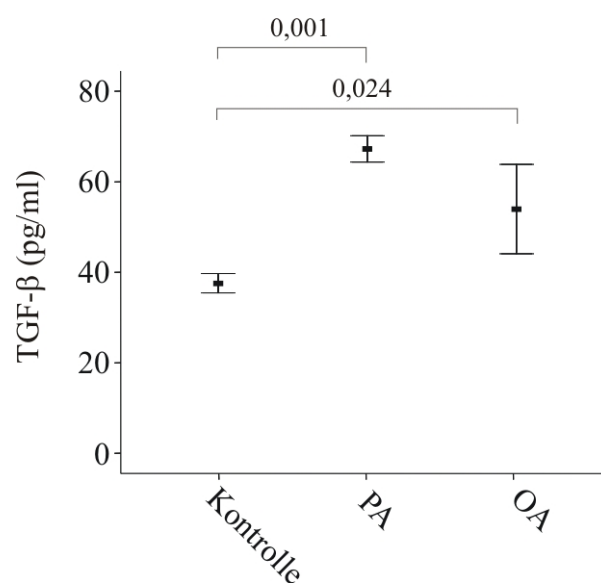


Abbildung 20: TGF- β 1 in Überständen von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 4 Spendern wurden untersucht), die 24 h mit 0,3 mM Palmitin (PA)- oder Ölsäure (OA) bzw. einer BSA Lösung als Kontrolle inkubiert wurden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit ELISA.

Die Inkubation mit Palmitin- und Ölsäure führte zu einer signifikanten Zunahme der TGF- β Konzentration im Überstand der primären humanen Hepatozyten (Abbildung 20).

3.2.2.3 TGF- β reduziert den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A im Überstand

Primäre humane Hepatozyten wurden mit rekombinatem humanem TGF- β 1 vorinkubiert und dann mit Adiponectin stimuliert. Activin A wurde im Überstand der Zellen gemessen.

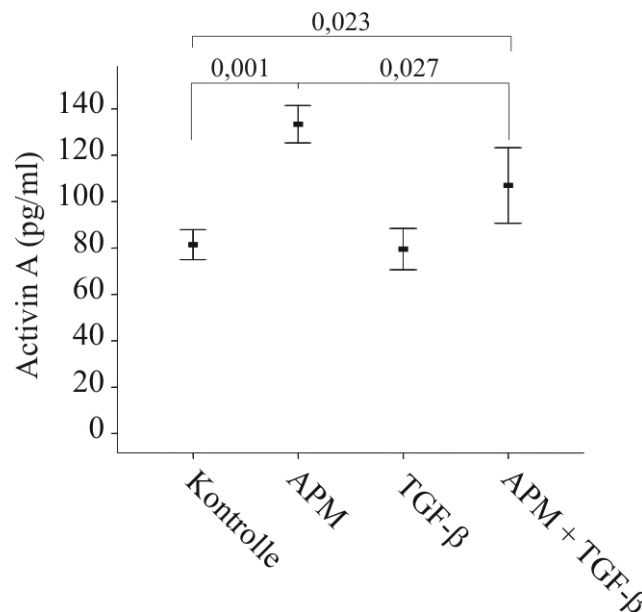


Abbildung 21: Activin A in Überständen von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 4 Spendern wurden untersucht), die für 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin (APM), 0,4 ng/ml TGF- β 1 (TGF- β), PBS als Kontrolle inkubiert wurden oder 1 h mit 0,4 ng/ml TGF- β 1 vorinkubiert und anschließend 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin stimuliert wurden (APM + TGF- β).

Nach Vorinkubation der Zellen mit TGF- β und anschließender Stimulation mit Adiponectin war die Activin A Konzentration im Überstand signifikant geringer als in den Überständen der Zellen, die nur mit Adiponectin inkubiert wurden. Die Activin A Konzentration nahm aber in den TGF- β -vorinkubierten und Adiponectin stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-inkubierten Zellen immer noch signifikant zu. Die Inkubation mit TGF- β alleine hatte keinen Einfluss auf Activin A (Abbildung 21).

3.2.2.4 Palmitin- und Ölsäure blockieren die durch Adiponectin induzierte Translokation von NF- κ B p65 in den Kern

Im folgenden Abschnitt wurde genauer untersucht über welchen Signalweg Adiponectin die Induktion von Activin A in Hepatozyten vermittelt. Dazu wurden zunächst primäre humane Hepatozyten mit Adiponectin stimuliert oder mit Palmitin- und Ölsäure vorinkubiert und anschließend Adiponectin auf die Zellen gegeben. In diesen Zellen wurde dann die Proteinmenge von NF- κ B p65 im Kernlysate mit Hilfe eines Western Blots untersucht.

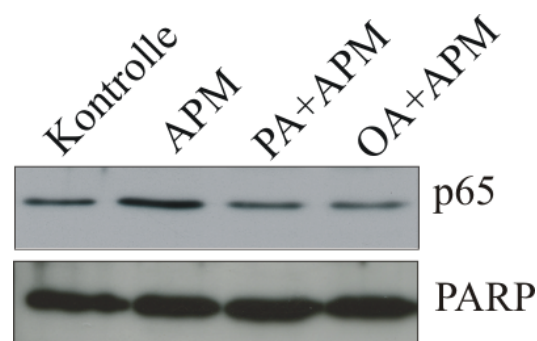


Abbildung 22: NF- κ B p65 und PARP Protein in Kernlysaten von primären humanen Hepatozyten, die 30 min mit 10 μ g/ml Adiponectin (APM), PBS als Kontrolle oder 24 h mit 0,3 mM Palmitin (PA)- oder Ölsäure (OA) vorinkubiert wurden und anschließend für 30 min mit Adiponectin stimuliert wurden. Repräsentativer Western Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Adiponectin erhöhte nach einer Stimulationszeit von 30 min die p65 Proteinmenge im Kern. Das bedeutet, dass Adiponectin in primären humanen Hepatozyten NF- κ B aktiviert. Nach Vorinkubation der Zellen mit Palmitin- und Ölsäure zeigte sich nach 30 minütiger Stimulation mit Adiponectin keine erhöhte p65 Proteinmenge im Zellkern. In mit Palmitin- und Ölsäure verfetteten Hepatozyten war Adiponectin nicht mehr in der Lage NF- κ B zu aktivieren (Abbildung 22).

3.2.2.5 Die Blockade von NF- κ B reduziert den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A

Um zu testen, ob die Induktion von Activin A und die Reduktion von Follistatin durch Adiponectin über die Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird, wurden primäre humane Hepatozyten mit dem in Solution NF- κ B Inhibitor [70] vorinkubiert und anschließend durch Stimulation mit Adiponectin überprüft, welchen Einfluss die Blockierung des NF- κ B Signalwegs auf die Induktion von Activin A und die Reduktion von Follistatin im Überstand der Zellen hat.

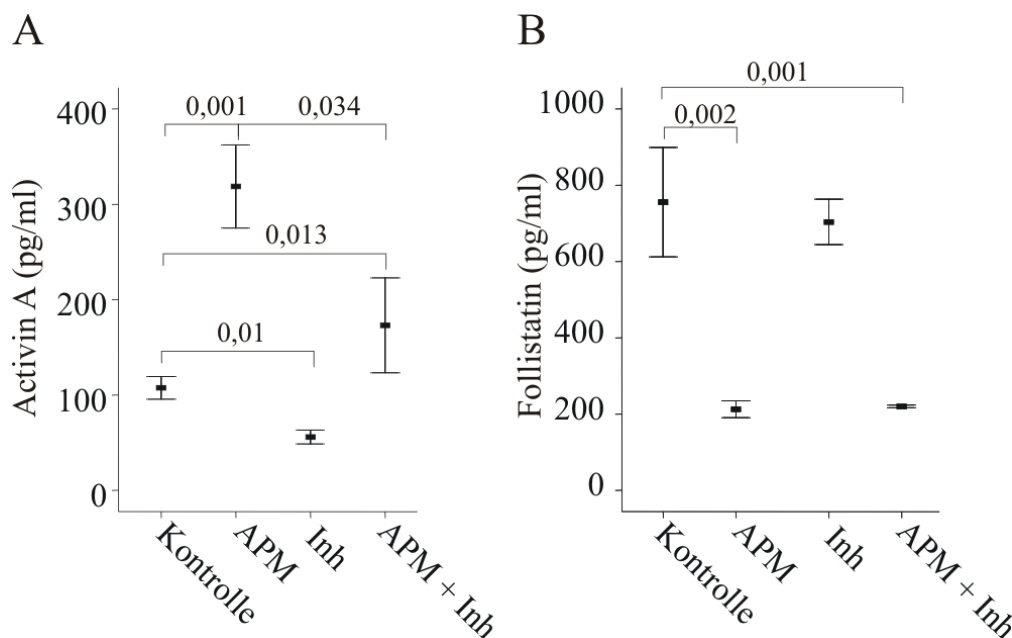


Abbildung 23: (A) Activin A und (B) Follistatin in Überständen von primären humanen Hepatozyten (Hepatozyten von 4 Spendern wurden untersucht) inkubiert für 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin (APM), 0,5 μ M in Solution NF- κ B Inhibitor (Inh), PBS als Kontrolle oder 1 h vorinkubiert mit in Solution NF- κ B Inhibitor und anschließend 24 h stimuliert mit Adiponectin (APM+Inh).

Die Hemmung von NF- κ B hatte keinen Einfluss auf die durch Adiponectin vermittelte Reduktion von Follistatin im Überstand der Hepatozyten (Abbildung 23B). Die Inkubation mit dem Inhibitor führte jedoch basal bereits zu einer signifikanten Reduktion von Activin A in den Zellüberständen (Abbildung 23A). Die Erhöhung von Activin A durch Adiponectin war in Hepatozyten mit bzw. ohne Hemmung von NF- κ B vergleichbar.

3.2.2.6 Adiponectin induziert Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) in primären humanen Hepatozyten

STAT3 wird durch Phosphorylierung aktiviert und bildet dann ein Homodimer, das als aktiver Transkriptionsfaktor in den Kern wandert [71]. Es ist bereits bekannt, dass Interleukin 6 (IL-6) und Leptin STAT3 über eine Aktivierung der Januskinasen 1 und 2 aktivieren kann [72].

In primären humanen Hepatozyten wurde untersucht, ob Adiponectin in der Lage ist die Phosphorylierung von STAT3 zu induzieren.

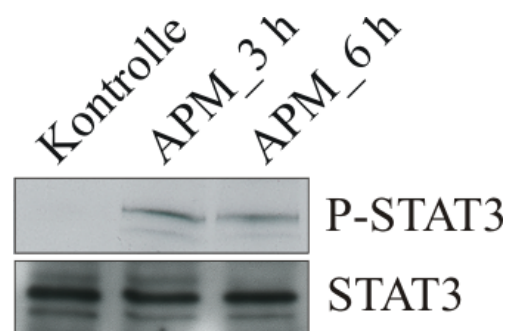


Abbildung 24: Phospho STAT3 (P-STAT3) und STAT3 Protein im Zelllysate von primären humanen Hepatozyten nach Inkubation mit 10 µg/ml Adiponectin (APM) für drei und sechs Stunden.

Adiponectin induzierte die Phosphorylierung von STAT3 maximal nach einer Stimulationszeit von 3 h (Abbildung 24). Der STAT3 Inhibitor VI von Calbiochem konnte die Induktion der Phosphorylierung durch Adiponectin blockieren (nicht gezeigt). Der Januskinase 2 (JAK2) Inhibitor AG490, von dem bereits bekannt war, dass er die durch IL-6 induzierte Phosphorylierung von STAT3 verhindern kann [73], hatte dagegen keinen Einfluss auf den Adiponectineffekt (nicht gezeigt). Adiponectin ist also in der Lage STAT3 in primären Hepatozyten zu aktivieren, die Induktion der Phosphorylierung wird aber nicht durch die Januskinase 2 vermittelt. Die Blockierung der Adiponectin-induzierten STAT3 Aktivierung hatte keinen Einfluss auf Activin A und Follistatin im Überstand der Hepatozyten (nicht gezeigt). Adiponectin ist auch in der Lage PPAR- α zu aktivieren [74]. Dieser Signalweg war aber auch nicht an der Regulation von Activin A und Follistatin durch Adiponectin beteiligt (nicht gezeigt).

3.2.2.7 Der hemmende Effekt von Palmitin-und Ölsäure auf die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A kann durch Blockierung der TGF- β Signaltransduktion aufgehoben werden

Palmitin- und Ölsäure induzieren TGF- β im Überstand der primären humanen Hepatozyten (Abbildung 20). Es wäre daher möglich, dass der inhibitorische Effekt dieser Fettsäuren auf die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A über TGF- β vermittelt wird. TGF- β könnte autokrin und/oder parakrin auf die Zellen wirken und mit dem Adiponectinsignalweg interferieren. Um diese Theorie zu testen wurden primäre Hepatozyten nach Verfettung mit Palmitinsäure mit Inhibitoren des TGF- β Signalwegs vorinkubiert und dann der Einfluss dieser Behandlung auf den induktiven Effekt von Adiponectin auf die Activin A Konzentration im Zellüberstand untersucht. Der SMAD3 Inhibitor SIS3 ist ein Indolderivat, das als Ligand für SMAD3 konstruiert wurde. SIS3 unterdrückt die TGF- β induzierte Phosphorylierung von SMAD3 und die Interaktion von SMAD3 und SMAD4 [75]. SB431542 ist ein ATP Kinase Inhibitor der TGF- β Superfamilie Typ I Activin Rezeptor Like Kinase (Alk) Rezeptoren Alk4, Alk5 und Alk7 [76].

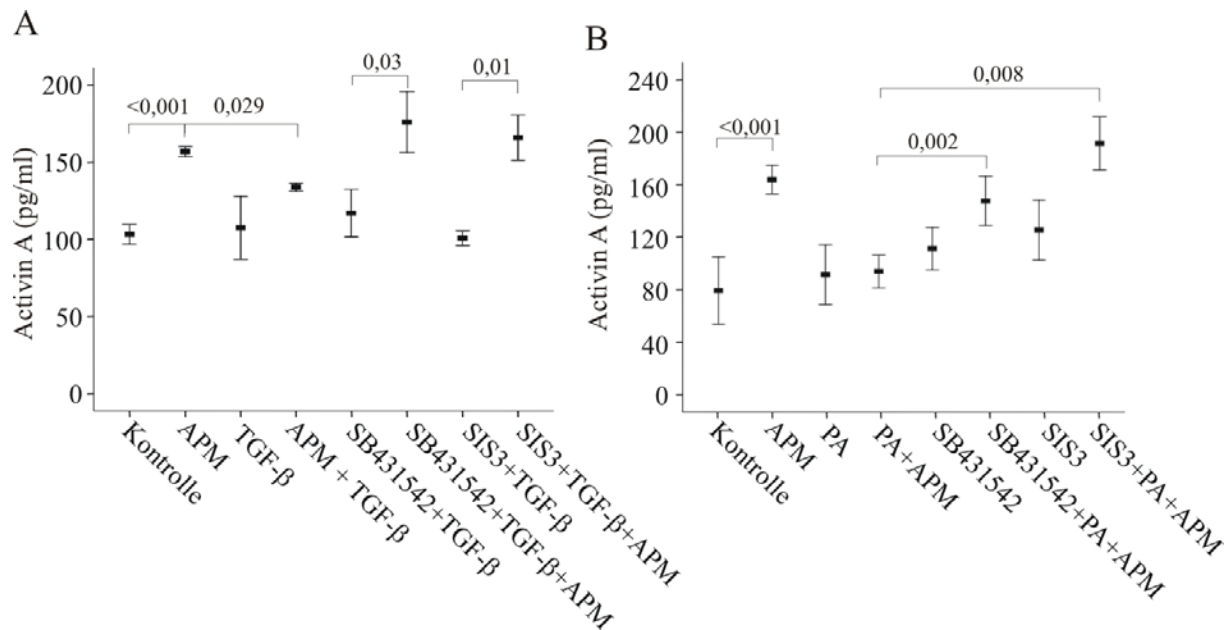


Abbildung 25: (A) Activin A in den Überständen von primären humanen Hepatozyten, die 24 h mit 10 µg/ml Adiponectin (APM), 0,4 ng/ml TGF-β1, TGF-β1 und Adiponectin inkubiert wurden. Mit den Inhibitoren (10µM des Alk5 Inhibitors SB431542 oder 10 µM des SMAD3 Inhibitors SIS3) wurde 1 h vorinkubiert und anschließend mit TGF-β1, Adiponectin oder TGF-β1 und Adiponectin in Kombination stimuliert. (B) Activin A in Überständen von primären humanen Hepatozyten, die 24 h mit 10 µg/ml Adiponectin (APM), 0,3 mM Palmitinsäure (PA), PA und Adiponectin inkubiert wurden. Mit den Inhibitoren (10µM des Alk5 Inhibitors SB431542 oder 10 µM des SMAD3 Inhibitors SIS3) wurde 1 h vorinkubiert und anschließend mit PA, Adiponectin oder PA und Adiponectin in Kombination stimuliert. Es wurden Hepatozyten von zwei Spendern in jeweils 2 unabhängigen Versuchen auf diese Weise stimuliert und zur Auswertung herangezogen.

TGF-β inhibierte wie oben gezeigt die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A in den primären humanen Hepatozyten. Adiponectin erhöhte die Activin A Konzentration im Überstand wieder signifikant nach Vorinkubation der Zellen mit SB431542 oder SIS3 zusätzlich zu TGF-β. Die Blockierung des TGF-β Signalwegs mit dem Alk5 Inhibitor SB431542 und dem SMAD3 Inhibitor SIS3 hebt den inhibitorischen Effekt von TGF-β auf die von Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A auf. TGF-β übt seinen inhibitorischen Effekt auf die Adiponectin Wirkung hier also über die Aktivierung des Alk5-SMAD Signalwegs aus (Abbildung 25A).

Die Vorinkubation mit Palmitinsäure blockierte die Adiponectin-induzierte Erhöhung von Activin A im Überstand der Zellen. Inhibiert man jedoch Alk5 mit SB431542 oder SMAD3 mit SIS3, so induzierte Adiponectin auch nach Verfettung der Zellen mit Palmitinsäure wiederum die Activin A Menge im Zellüberstand (Abbildung 25B).

3.2.3 Activin A und Follistatin im Serum von Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber

Activin A und Follistatin wurden im Serum von Patienten mit und ohne Fettleber gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kontrollpersonen sich im Body Mass Index (BMI) nicht signifikant von den Fettleberpatienten unterschieden. Außerdem wurden nur Patienten zur Messung herangezogen, die geringe Mengen oder keinen Alkohol konsumierten und auch keine anderen Leberkrankheiten aufwiesen (Tabelle 2).

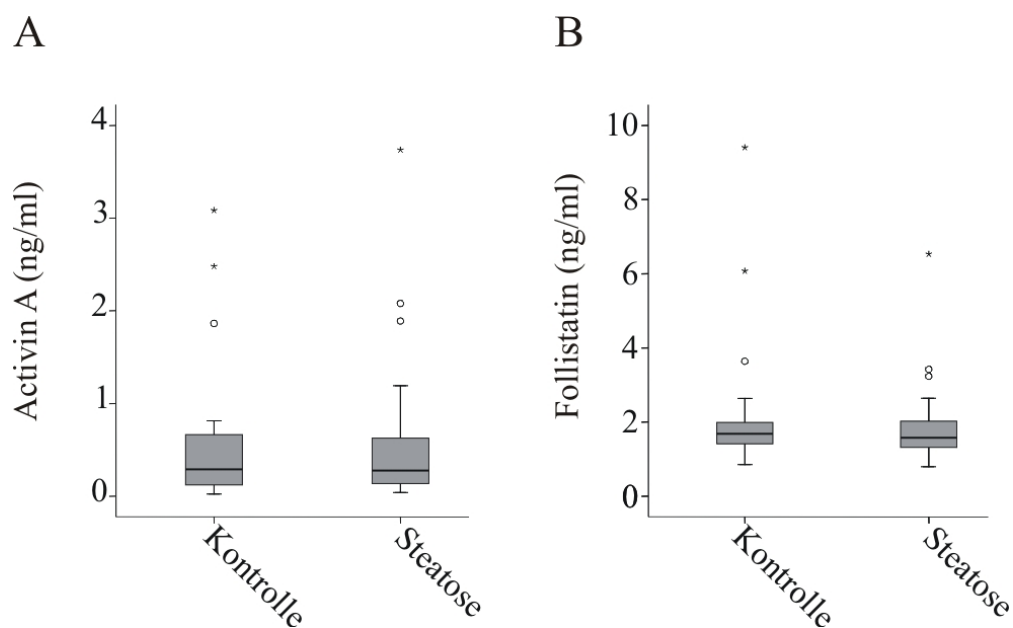


Abbildung 26: Serumkonzentration von (A) Activin A und (B) Follistatin in Patienten mit (Steatose; 25) und ohne (Kontrolle; 23) sonographisch diagnostizierter Fettleber.

Die Activin A und Follistatin Serumkonzentration war in den Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber unverändert (Abbildung 26).

3.3 Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β Wirkung in der Leber

Im folgenden Abschnitt werden die Experimente, die klären sollten ob Adiponectin in der Leber Effekte ausübt, die die Wirkung des profibrogenen Faktors TGF- β beeinflussen, zusammengefasst.

3.3.1 BAMBI und CTGF Proteinmenge in der NAFLD

BAMBI inhibiert die TGF- β Signaltransduktion (Abschnitt 1.3.2), CTGF unterstützt die Wirkung von TGF- β (Abschnitt 1.3.3). Eine Veränderung der Menge dieser Proteine in der Fettleber trägt zu einer veränderten TGF- β Aktivität bei.

3.3.1.1 CTGF Protein ist in der Fettleber unverändert, während BAMBI reduziert ist

Die BAMBI und CTGF Proteinmenge wurde in den Lebern von Spendern mit und ohne Fettleber bestimmt. PPAR- α wurde analysiert, da dieser Transkriptionsfaktor über AdipoR2 reguliert wird, dessen Expression wie in Abbildung 9 gezeigt, in der humanen Fettleber vermindert ist. Für die Western Blots wurde Gesamtleberlysat aus Biopsiematerial verwendet (Tabelle 1).

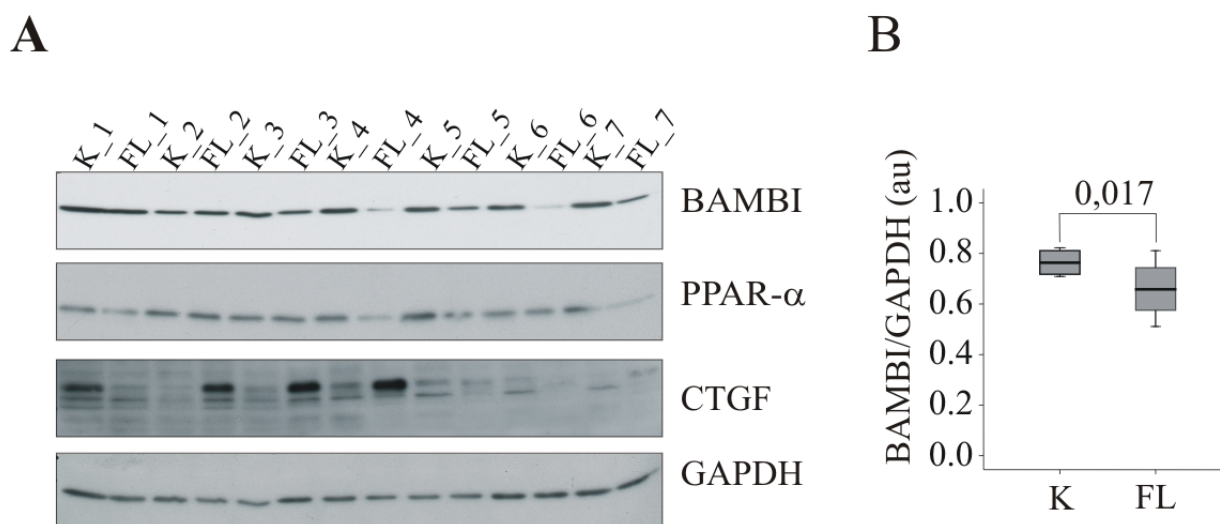


Abbildung 27: (A) BAMBI, PPAR- α , CTGF und GAPDH Proteinmenge im Gesamtleberlysat von Spendern mit und ohne Fettleber. (B) Quantifizierung der Schwärzung des Röntgenfilms des BAMBI Western Blots bezogen auf die Intensität des GAPDH Signals.

Es zeigte sich kein konsistenter Unterschied in der CTGF Proteinmenge zwischen den Spendern mit und ohne Fettleber (Abbildung 27A). Nach optischer Quantifizierung der BAMBI Signale ergab sich jedoch eine signifikante Reduktion der BAMBI Proteinmenge in den Lebern der steatotischen Patienten (Abbildung 27B).

3.3.1.2 Die BAMBI Proteinmenge zeigt eine negative Korrelation mit dem BMI

Die optische Quantität der BAMBI Signale in Abbildung 27 wurde in Beziehung mit dem BMI der jeweiligen Spender gesetzt.

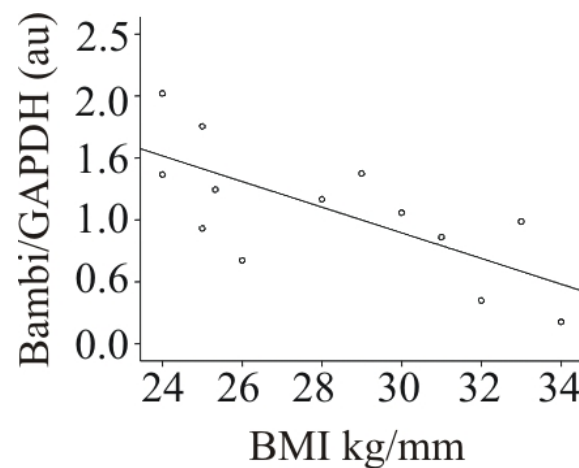


Abbildung 28: Korrelation der BAMBI Proteinmenge bezogen auf die GAPDH Menge in der Leber mit dem BMI der jeweiligen Spender.

Die BAMBI Proteinmenge in der Leber korrelierte negativ mit dem BMI ($r = -0,702$, $p < 0,05$) (Abbildung 28).

3.3.1.3 Das BAMBI Protein ist in der Leber von Mäusen, die mit Paigendiät oder MCD-Diät gefüttert wurden reduziert

Zur Untersuchung der BAMBI Expression in der NASH und Fibrose wurden C57/Bl6 Mäuse für 16 Wochen mit Paigendiät und 14 Wochen mit MCD Diät gefüttert. Danach wurde die BAMBI Proteinmenge im Gesamtleberlysate dieser Mäuse bestimmt und mit der Proteinmenge in der Leber von Mäusen verglichen, die mit Standarddiät gefüttert wurden.

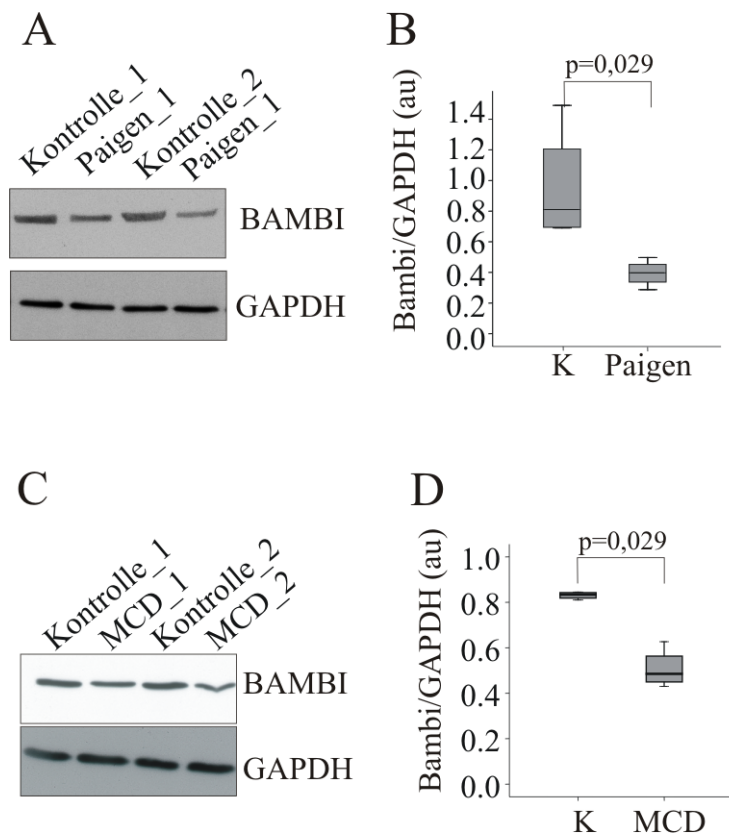


Abbildung 29: BAMBI Protein und GAPDH Protein als Ladungskontrolle in der Leber von (A) Mäusen, die 16 Wochen auf Paigen Diät gehalten wurden und (C) Mäusen, die 14 Wochen auf MCD Diät gehalten wurden, sowie Mäusen die über den gleichen Zeitraum auf einer Standarddiät gehalten wurden als Kontrolle. (B, D) Optische Quantifizierung der Western Blot Signale in A und C. Es wurden jeweils vier Mäuse pro Gruppe untersucht und zur Auswertung herangezogen.

BAMBI war in der NASH Leber der Paigenmäuse (Abbildung 29A und B) und in der fibrotischen Leber der MCD Mäuse reduziert (Abbildung 29C und D).

3.3.2 Expression von BAMBI in Leberzellen

Des Weiteren wurde untersucht welche Zellen in der Leber BAMBI Protein synthetisieren.

3.3.2.1 Primäre humane Hepatozyten und primäre humane hepatische Sternzellen erzeugen unterschiedliche BAMBI-Isoformen

Die Expression von BAMBI wurde in Kupffer Zellen, primären Hepatozyten und primären hepatischen Sternzellen untersucht, die aus humaner Leber isoliert wurden.

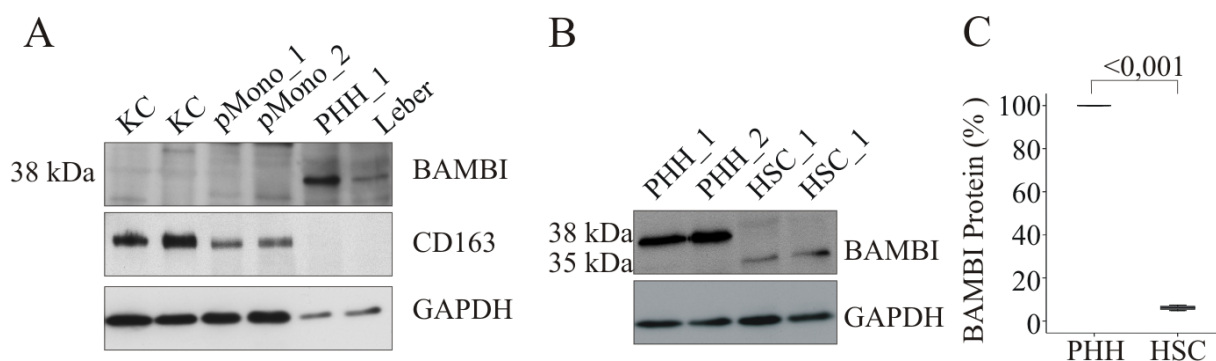


Abbildung 30: (A) BAMBI, CD163 und GAPDH Protein in Kupffer Zellen (KC), primären humanen peripheren Blutmonozyten (pMono), primären humanen Hepatozyten (PHH) und Gesamtleberlysate. (B) BAMBI und GAPDH Western Blot Signale in PHH und primären humanen hepatischen Sternzellen (HSC). (C) Quantifizierung der Western Blot Signale in C.

In Kupffer Zellen ebenso wie in peripheren humanen Blutmonozyten war im Western Blot kein BAMBI Protein nachweisbar. CD163 Protein ist ein Marker für Monozyten und Kupffer Zellen (Abbildung 30A). In primären humanen Hepatozyten und hepatischen Sternzellen detektierte der Antikörper ein Protein. Die Bande in den Hepatozyten erscheint jedoch bei 38 kDa, während in den Sternzellen eine Bande bei einer Größe von 35 kDa zu sehen war (Abbildung 30B). Dieses Ergebnis ergab sich unabhängig voneinander bei Verwendung von zwei verschiedenen monoklonalen murinen anti-Human BAMBI Antikörpern. Die aus der Hepatozyten mRNA abgeleitete cDNA wurde sequenziert und stimmt mit der RefSeq für BAMBI überein. Daher muss man davon ausgehen, dass in Hepatozyten und Sternzellen das BAMBI Protein unterschiedlich modifiziert wird und sich daraus die unterschiedlichen Proteingrößen ergeben. In den primären Hepatozyten war die BAMBI Proteinmenge wesentlich höher als in den hepatischen Sternzellen. Als Ladungskontrolle für diese

Quantifizierung diente die GAPDH Proteinmenge, die in beiden Zelltypen den gleichen Anteil an der Gesamtproteinmenge ausmacht (Abbildung 30C).

3.3.2.2 Die BAMBI Proteinmenge ist in den hepatozytären Zelllinien HepG2 und Hep3B im Vergleich zu primären Hepatozyten stark reduziert

Die mRNA und Protein-Expression von BAMBI wurde in den humanen hepatozytären Karzinomzelllinien HepG2 und Hep3B bestimmt und mit der Expression in primären humanen Hepatozyten verglichen.

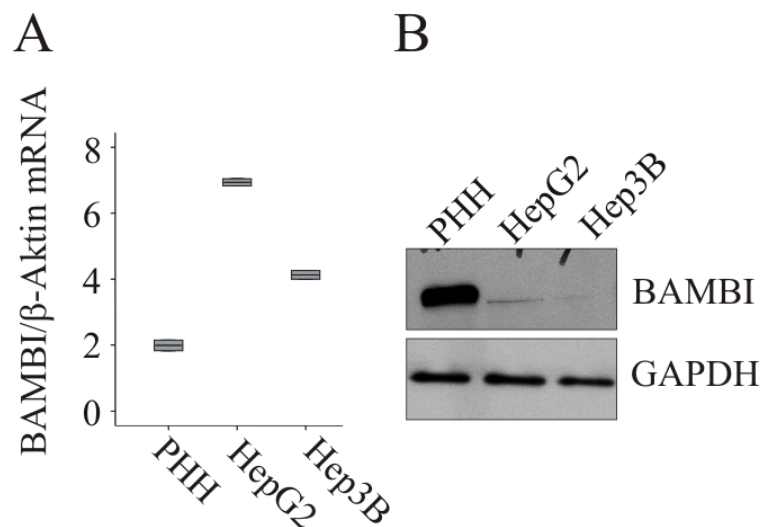


Abbildung 31: (A) BAMBI mRNA geteilt durch β -Aktin mRNA als Haushaltsgen in PHH, HepG2 und Hep3B. (B) BAMBI und GAPDH Protein in PHH, HepG2 und Hep3B.

Die BAMBI Proteinmenge war in den Tumorzellen deutlich geringer als in den primären Zellen, obwohl die Tumorzellen mehr BAMBI mRNA produzierten als die primären Hepatozyten (Abbildung 31). Die reduzierte BAMBI Proteinmenge in Tumorzellen könnte dazu beitragen, dass die TGF- β Wirkung erhöht ist und dadurch die Metastasierung gefördert wird.

3.3.3 Die Überexpression von BAMBI in HepG2 reduziert den induktiven Effekt von TGF- β auf die Produktion von CTGF

Als nächstes wurde untersucht ob BAMBI in Hepatozyten die Wirkung von TGF- β inhibieren kann. Dazu wurde die für BAMBI kodierende cDNA in einen TOPO Vektor eingebracht und HepG2 Zellen zur Überexpression des BAMBI Proteins mit diesem Vektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit TGF- β stimuliert und die Auswirkung der erhöhten BAMBI Proteinmenge auf die TGF- β -induzierte Induktion von CTGF untersucht. HepG2 Zellen haben, wie in Abbildung 31 gezeigt, selbst nur eine sehr geringe Menge an BAMBI Protein. Die BAMBI Proteinmenge kann durch die Überexpression in diesen Zellen also um ein vielfaches erhöht werden. Damit sollte die Auswirkung der veränderten Menge dieses TGF- β Pseudorezeptors auf die Wirkung von TGF- β besonders deutlich zu sehen sein.

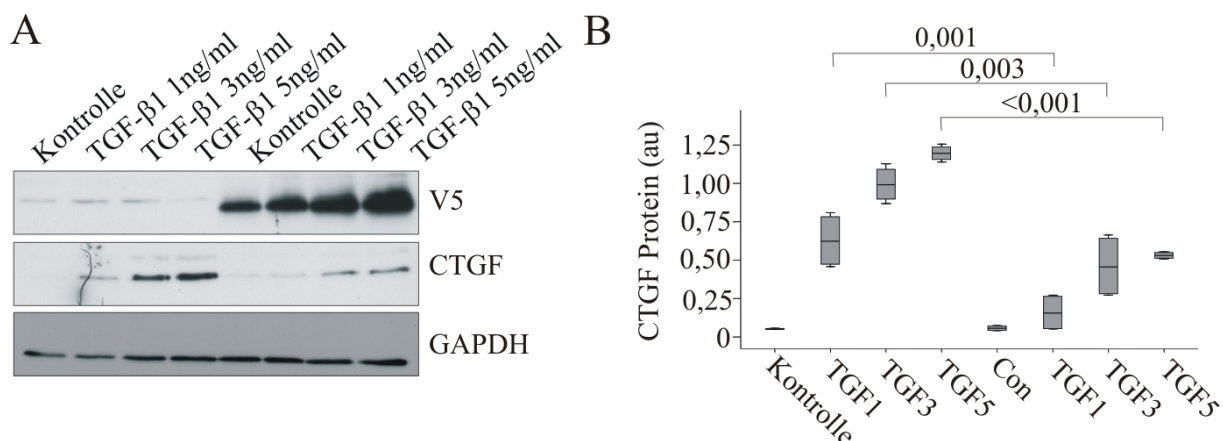


Abbildung 32: (A) V5, CTGF und GAPDH Western Blot Signale in HepG2 nach 72 h Überexpression von BAMBI mit karboxyterminalem V5 Tag oder lacZ als Kontrolle und anschließender 24 h Stimulation mit rekombinantem humanem TGF- β 1 oder Wasser als Kontrolle. (B) Optische Quantifizierung der CTGF Signale in A. Die Ergebnisse wurden in vier unabhängigen Experimenten bestätigt.

Das BAMBI Protein ist am Karboxyterminus mit einem V5 Tag versehen. In Abbildung 31A zeigt das V5 Signal in den Spuren fünf bis acht an, dass die HepG2 Zellen BAMBI Protein produziert haben. In den Spuren eins bis vier wurden Lysate von Zellen aufgetragen, die mit dem lacZ Kontrollvektor transfiziert wurden. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Hepatozyten mit 1, 3 und 5 ng/ml TGF- β in den lacZ transfizierten Zellen zu einer signifikant höheren CTGF Proteinmenge führte als in den BAMBI überexprimierenden Zellen. Das bedeutet, dass BAMBI in Hepatozyten in der Lage ist die TGF- β Signaltransduktion zu inhibieren (Abbildung 32A und B).

3.3.4 Einfluss von Adiponectin auf die Expression von BAMBI und CTGF in primären humanen Hepatozyten und primären humanen hepatischen Sternzellen

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Adiponectin auf die Expression von BAMBI und CTGF beschrieben. Durch die Regulation dieser beiden Proteine könnte Adiponectin die TGF- β Wirkung in der Leber indirekt beeinflussen.

3.3.4.1 Adiponectin induziert die BAMBI mRNA und das Protein in primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin stimuliert und der Effekt auf die Expression von BAMBI untersucht.

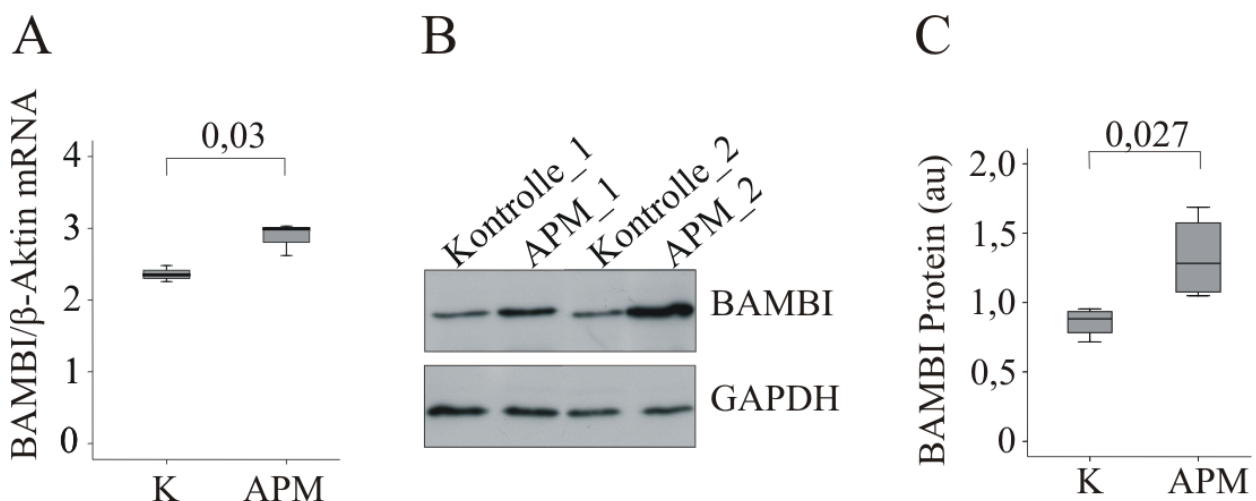


Abbildung 33: (A) BAMBI mRNA geteilt durch β -Aktin mRNA in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet), die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin, oder PBS als Kontrolle, stimuliert wurden. (B) BAMBI und GAPDH Protein in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet) nach 24 h Inkubation mit 10 μ g/ml Adiponectin oder PBS als Kontrolle. (C) Optische Quantifizierung der BAMBI Signale in B.

Adiponectin induzierte signifikant die BAMBI mRNA (Abbildung 33A) und erhöhte das BAMBI Protein in den primären Hepatozyten (Abbildung 33B und C). Durch die Induktion von BAMBI könnte Adiponectin der TGF- β Wirkung in Hepatozyten entgegenwirken.

3.3.4.2 Adipnectin induziert BAMBI Protein in hepatischen Sternzellen

Der stimulatorische Effekt von Adiponectin auf die BAMBI Proteinmenge im Zelllysate wurde auch in primären humanen hepatischen Sternzellen untersucht.

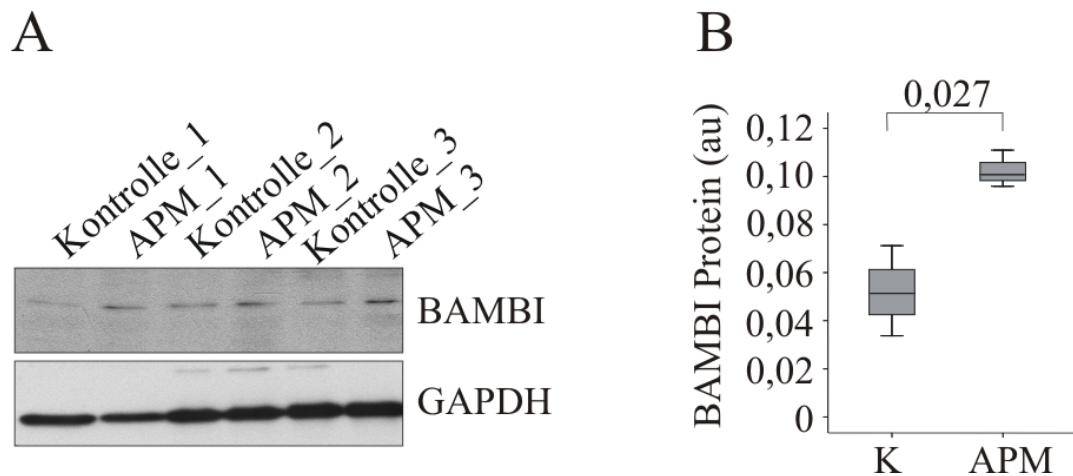


Abbildung 34: (A) BAMBI und GAPDH Protein in HSC von drei verschiedenen Spendern, die 24 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Adiponectin oder PBS als Kontrolle inkubiert wurden. (B) Optische Quantifizierung der Signale in A.

Adiponectin induzierte BAMBI Protein auch in hepatischen Sternzellen (Abbildung 34).

3.3.4.3 Die AMPK und NF- κ B sind an der Induktion von BAMBI durch Adiponectin in Hepatozyten beteiligt

Um den Signalweg näher zu untersuchen, über den Adiponectin die Induktion von BAMBI in primären Hepatozyten vermittelt, wurden primäre humane Hepatozyten mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten des Adiponectin Signalwegs inkubiert und die Auswirkung dieser Stimulationen auf die BAMBI Proteinmenge im Zelllysate untersucht.

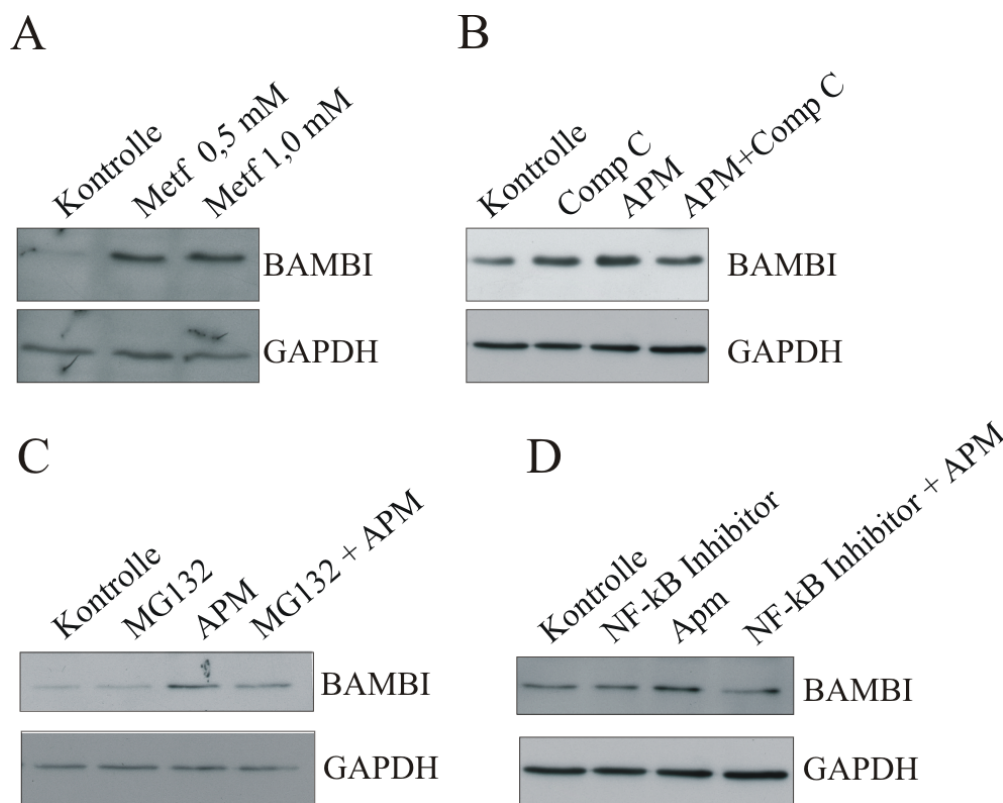


Abbildung 35: BAMBI und GAPDH Protein in PHH, die 24 h mit (A) Metformin, (B) 1 μ M des AMPK Inhibitors Compound C, (C) 10 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132, (D) 0,5 μ M des in Solution NF- κ B Inhibitors, 10 μ g/ml Adiponectin oder nach 1 h Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor für 24 h mit Adiponectin inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden die Zellen 24 h mit PBS inkubiert.

Adiponectin aktiviert in Hepatozyten die AMPK [77]. Das Medikament Metformin aktiviert ebenfalls die AMPK [56] und eine Stimulation von primären Hepatozyten mit Metformin führte zu einer Erhöhung von BAMBI Protein im Zelllysate (Abbildung 35A). Die Hemmung der AMPK durch Compound C [78] blockierte die Induktion von BAMBI Protein durch Adiponectin zumindest teilweise (Abbildung 35B). Dies lässt darauf schließen, dass die AMPK an der durch Adiponectin vermittelten Induktion von BAMBI in primären

Hepatozyten beteiligt ist. Der Proteasomeninhibitor MG132, der zu einer Reduktion der NF- κ B Aktivität führt [79], hob den Adiponectineffekt auf BAMBI ebenfalls zum Teil auf (Abbildung 35C). Auch die Inhibierung von NF- κ B führte zu einer deutlichen Senkung der Adiponectin induzierten BAMBI Proteinmenge in den Zellen (Abbildung 35D). Das bedeutet, dass auch die Aktivierung von NF- κ B durch Adiponectin in primären humanen Hepatozyten zu einer Induktion von BAMBI führt. Die Verwendung des ERK1/2 Inhibitors PD98059 [80], sowie der PPAR- α Agonisten Fenofibrat [57] und WY14643 [81] und des PPAR- α Antagonisten RU486 [82] zeigten, dass diese Signalmoleküle nicht an der Regulation von BAMBI in Hepatozyten beteiligt sind (Daten nicht gezeigt).

3.3.4.4 Adiponectin reduziert die CTGF mRNA und das Protein in primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin stimuliert und die Auswirkung auf die mRNA und Proteinmenge von CTGF untersucht.

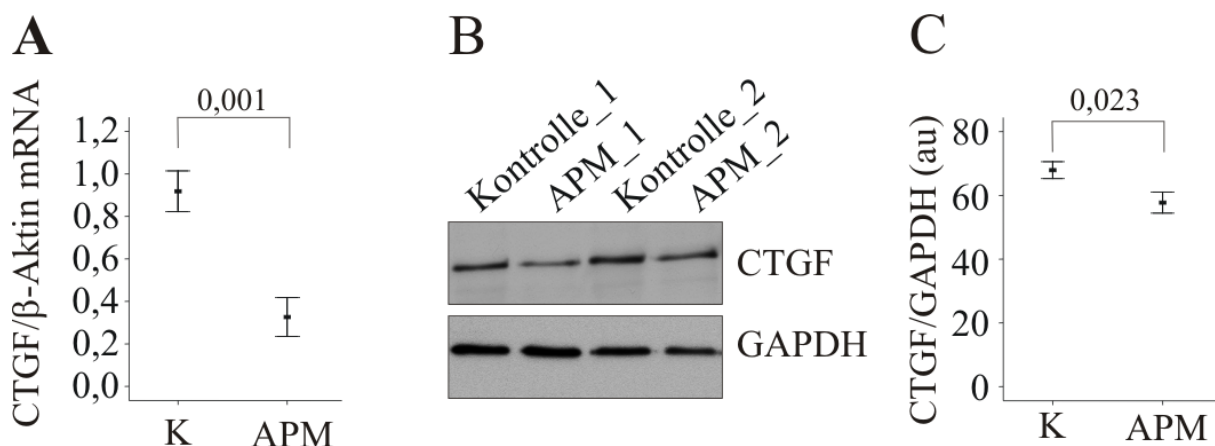


Abbildung 36: (A) CTGF mRNA geteilt durch β -Aktin mRNA in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet), die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin, oder PBS als Kontrolle, stimuliert wurden. (B) CTGF und GAPDH Protein in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden insgesamt verwendet) nach 24 h Inkubation mit 10 μ g/ml Adiponectin oder PBS als Kontrolle. (C) Optische Quantifizierung der Signale die zum Teil in B gezeigt sind.

Adiponectin reprimierte die CTGF mRNA (Abbildung 36A) und reduzierte CTGF Protein im Zelllysate der Hepatozyten (Abbildung 36B und C).

3.3.4.5 PPAR- α ist entscheidend an der Reduktion von CTGF durch Adiponectin in Hepatozyten beteiligt

Um herauszufinden, welche intrazellulären Signalmoleküle an der durch Adiponectin ausgelösten Reduktion von CTGF im Zelllysate der Hepatozyten beteiligt sind, wurden primäre humane Zellen mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten des Adiponectinsignalwegs inkubiert.

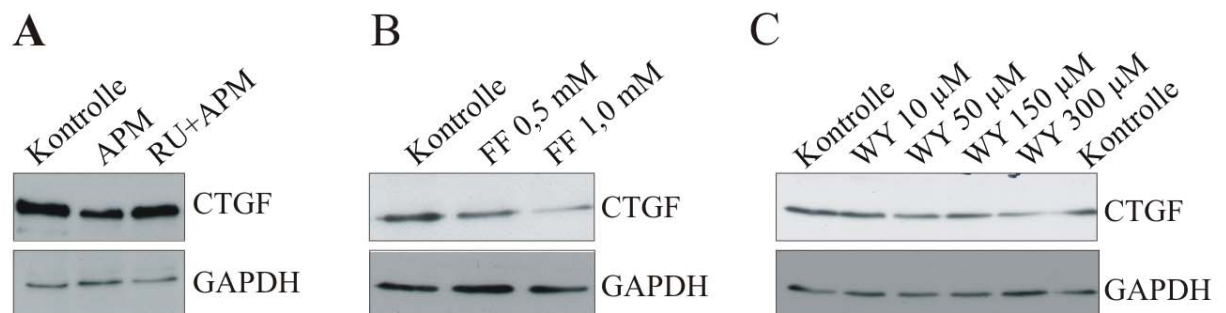


Abbildung 37: (A) CTGF und GAPDH Protein in PHH, die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin, PBS als Kontrolle, oder 1 h mit 10 μ M des PPAR- α Antagonisten RU486 und anschließend 24 h mit Adiponectin inkubiert wurden. (B) CTGF und GAPDH Protein in PHH, die 24 h mit den PPAR- α Agonisten Fenofibrat (FF), (C) WY14643 (WY) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle stimuliert wurden.

Die Verwendung von Metformin und Compound C in Kombination mit Adiponectin, sowie der Einsatz des in Solution NF- κ B Inhibitors und MG132 in Kombination mit Adiponectin zeigten, dass die AMPK und NF- κ B den Adiponectineffekt auf CTGF in Hepatozyten nicht beeinflussen. Auch die Vorinkubation der Zellen mit dem ERK1/2 Inhibitor PD98059 hatte keinen Einfluss auf den reprimierenden Effekt von Adiponectin auf CTGF (Daten nicht gezeigt). Die Vorinkubation der primären Hepatozyten mit dem PPAR- α Antagonisten RU486 konnte den reduktiven Effekt von Adiponectin auf die CTGF Proteinmenge im Zelllysate verhindern (Abbildung 37A). Zudem führte die Inkubation mit den PPAR- α Agonisten Fenofibrat (Abbildung 37B) und WY14643 (Abbildung 37C) zu einer dosisabhängigen Reduktion von CTGF. Die Reduktion von CTGF durch Adiponectin wird also über Aktivierung von PPAR- α ausgelöst.

3.3.5 Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3 in primären humanen Hepatozyten

Weiterhin wurde untersucht, ob Adiponectin direkt auf den TGF- β Signalweg in Hepatozyten Einfluss nimmt. Dazu wurde der Effekt von Adiponectin auf die TGF- β vermittelte Phosphorylierung der Signalmoleküle SMAD2 und 3 näher betrachtet.

3.3.5.1 Adiponectin inhibiert die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin vorinkubiert und dann mit TGF- β stimuliert. Die Menge an phosphoryliertem SMAD2 und 3 Protein in Hepatozyten wurde mit der in Zellen verglichen, die nur mit TGF- β inkubiert wurden. Außerdem wurde der Effekt einer Stimulation mit TGF- β und einer Kostimulation mit TGF- β und Adiponectin auf die Proteinmenge von BAMBI und CTGF in diesen Zellen untersucht.

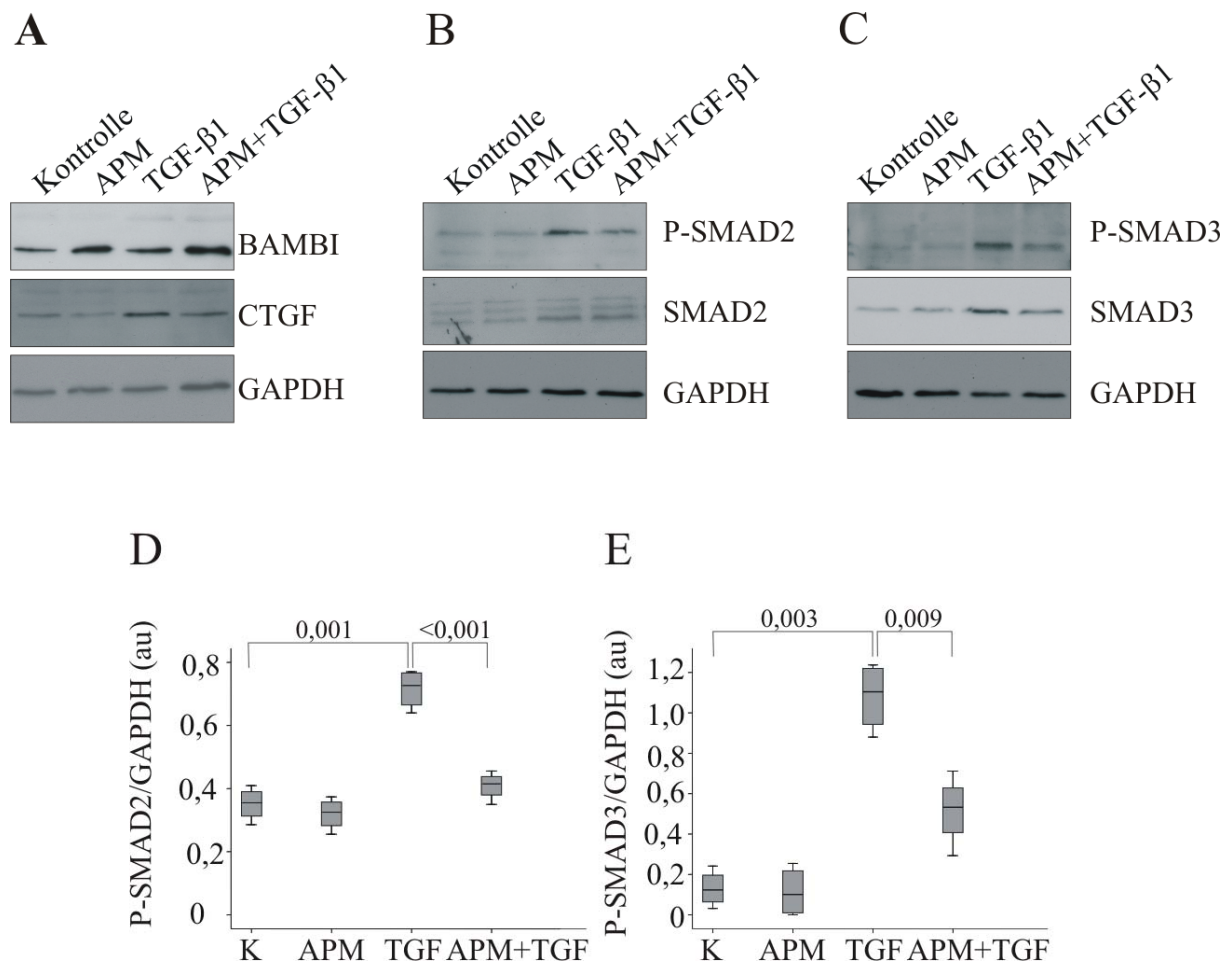


Abbildung 38: (A) BAMBI, CTGF und GAPDH Protein in PHH, die 24 h mit 10 µg/ml Adiponectin, 5 ng/ml TGF-β1, oder 1 h mit Adiponectin und anschließend für 24 h mit TGF-β1 inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden die Zellen 24 h mit PBS inkubiert. (B) Phospho SMAD2 und SMAD2, (C) Phospho SMAD3, SMAD3 und GAPDH in Zellen, die auf diese Weise stimuliert wurden. (D, E) Optische Quantifizierung der Signale dreier unabhängiger Versuche, die zum Teil in B und C gezeigt sind.

Adiponectin induzierte BAMBI auch in Gegenwart von TGF-β (Abbildung 38A). TGF-β induzierte CTGF in der Zelle. Bei Kostimulation mit Adiponectin und TGF-β heben sich der induktive Effekt von TGF-β und der reduktive Effekt von Adiponectin auf und die CTGF Proteinmenge war in etwa so hoch wie in den Kontroll-inkubierten Zellen (Abbildung 38A). Bei Kostimulation von Adiponectin mit TGF-β ist also die CTGF Menge niedriger und die BAMBI Menge höher als in Zellen, die nur mit TGF-β stimuliert wurden. Diese veränderten Proteinmengen an TGF-β Aktivator und Inhibitor lassen eine reduzierte TGF-β Aktivität hervorgerufen durch Adiponectin vermuten.

Die Vorinkubation mit Adiponectin führte zu einer Reduktion der Menge an phosphoryliertem SMAD2 nach TGF-β Stimulation (Abbildung 38B und D). Die Gesamtmenge an SMAD2

wurde weder durch Adiponectin noch durch TGF- β verändert (das SMAD2 Signal ist die oberste der drei Banden im mittleren Western Blot in Abbildung 38B). Adiponectin senkte ebenfalls die durch TGF- β erhöhte Menge an phosphoryliertem SMAD3. TGF- β erhöhte auch die Gesamtproteinmenge von SMAD3 und Adiponectin war auch in der Lage diesen Effekt zu inhibieren (Abbildung 38C und E).

Adiponectin inhibiert also die TGF- β Signaltransduktion in primären humanen Hepatozyten und dies könnte zumindest zum Teil durch die Induktion von BAMBI und die Reduktion von CTGF in diesen Zellen zustande kommen.

3.3.5.2 Der PPAR- α Agonist WY14643 inhibiert die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3

Primäre humane Hepatozyten wurden mit dem PPAR- α Agonisten WY14643 vorinkubiert und anschließend mit TGF- β stimuliert. Die Auswirkung der Aktivierung von PPAR- α auf die TGF- β -induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und 3 wurde im Western Blot untersucht.

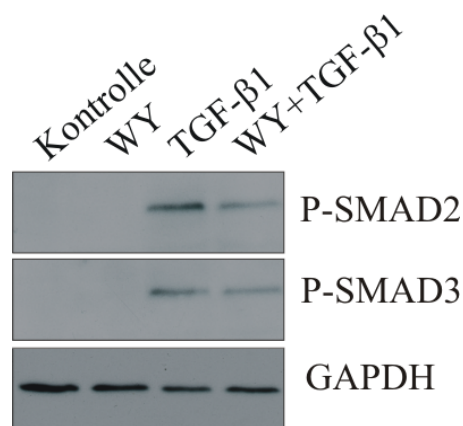


Abbildung 39: Phospho SMAD2, Phospho SMAD3 und GAPDH Protein in PHH, die 24 h mit dem PPAR- α Agonisten WY14643, 5 ng/ml TGF- β 1 oder 1 h mit WY14643 und anschließend 24 h mit TGF- β 1 inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO inkubiert. Das Ergebnis wurde mit Hepatozyten eines weiteren Spenders bestätigt.

Der PPAR- α Agonist reduzierte die Induktion der Phosphorylierung von SMAD2 und 3 durch TGF- β (Abbildung 39). Die Aktivierung von PPAR- α führt wie bereits in Abbildung 37 gezeigt zu einer Reduktion von CTGF, wodurch sich eine verminderte TGF- β Signaltransduktion erklären ließe. PPAR- α könnte aber auch direkt mit dem TGF- β Signalweg in Wechselwirkung treten.

3.3.6 Einfluss von Adiponectin auf die Aktivität von MMP-9

Entscheidend für die Progression der NASH und Fibrose ist die Veränderung der Leberarchitektur. Dabei spielt die Umgestaltung der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle. Dieser Prozess wird vorangetrieben durch die veränderte Freisetzung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases (TIMPs).

3.3.6.1 Die MMP-9 Aktivität ist in der Fettleber unverändert, aber in der fibrotischen Leber erhöht

Die Aktivität der MMP-9 wurde in nicht reduzierenden Proteinlysaten von Lebern humaner Spender mit und ohne Fettleber und mit Leberfibrose bestimmt (Tabelle 1).

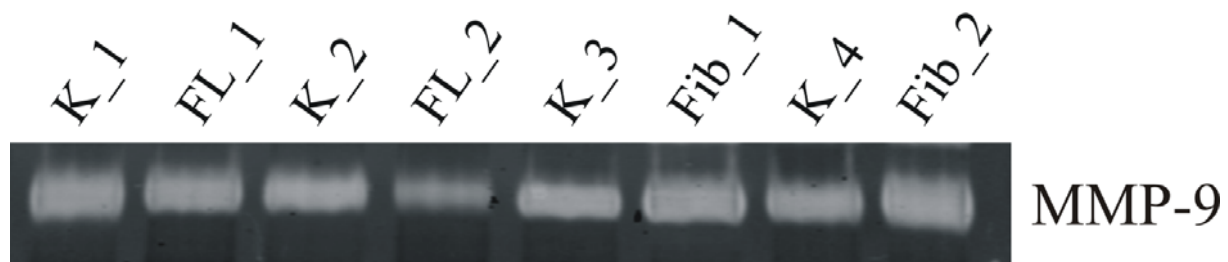


Abbildung 40: MMP-9 Aktivität bestimmt über Gelatine Zymographie im Gesamtleberlysat von humanen Spendern mit und ohne Fettleber (FL) oder fibrotischer Leber (Fib).

Die Aktivität der MMP-9 war in der Fettleber im Vergleich zu den Kontrollen unverändert, in der fibrotischen Leber aber erhöht (Abbildung 40).

3.3.6.2 Adiponectin erhöht die MMP-9 mRNA und Aktivität in primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin stimuliert und die Auswirkung dieser Stimulation auf die MMP-9 mRNA Expression und die MMP-9 Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt.

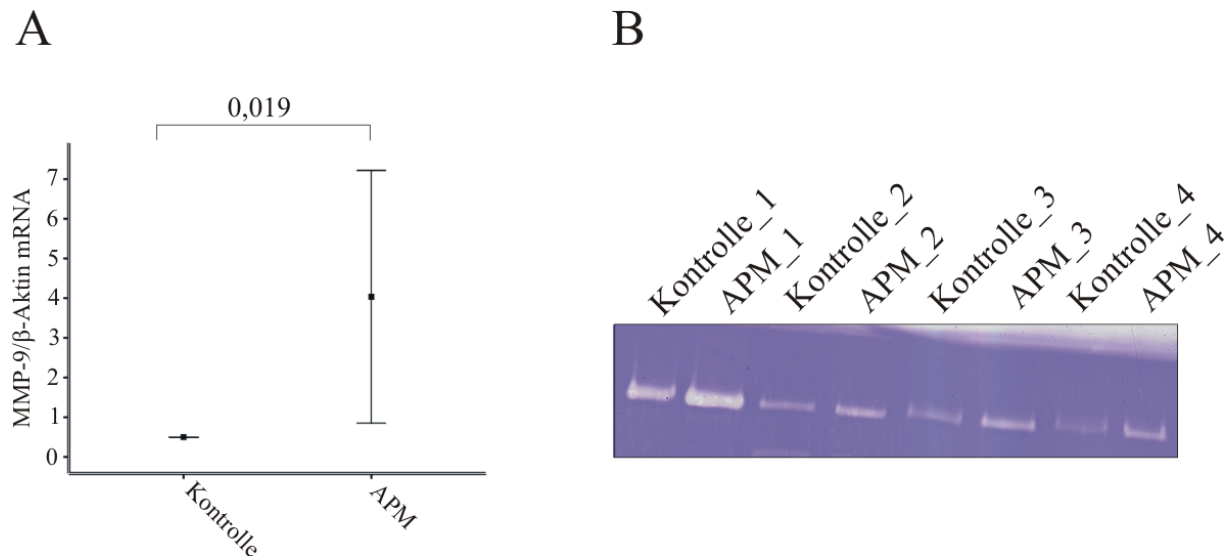


Abbildung 41: (A) MMP-9 mRNA geteilt durch β -Aktin mRNA in PHH, die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin inkubiert wurden. (B) MMP-9 Aktivität in den Überständen dieser Zellen.

Adiponectin induzierte die MMP-9 mRNA (Abbildung 41A) und erhöhte die MMP-9 Aktivität im Überstand der Hepatozyten (Abbildung 41B).

3.4 Einfluss von Adiponectin auf Chemerin und CMKLR1 in der Leber

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse bezüglich Chemerin, das ursprünglich als vom Fettgewebe freigesetztes Protein beschrieben wurde [83], hinsichtlich seiner Expression in der Leber und seiner Wirkung auf Hepatozyten untersucht.

3.4.1 Chemerin Protein ist in der Fettleber unverändert, während CMKLR1 reduziert ist

Um Rückschlüsse auf die Aktivität von Chemerin in der Fettleber und der nicht verfetteten Leber zu erhalten wurden Gesamtleberlysate von humanen Spendern auf die Proteinmenge von Chemerin und seinem Rezeptor CMKLR1 hin untersucht (Tabelle 1).

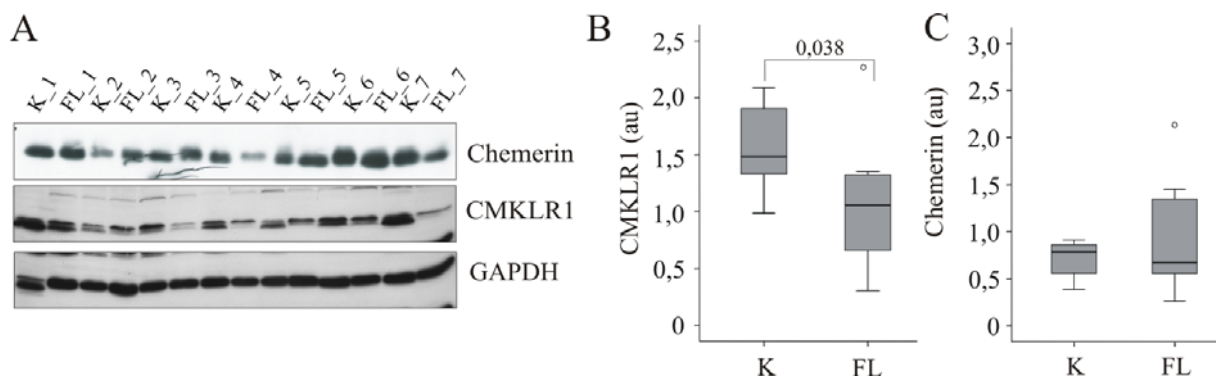


Abbildung 42: (A) Chemerin, CMKLR1 und GAPDH Protein in den Lebern humaner Spender mit und ohne Fettleber. (B, C) Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Signale in A.

Die Chemerin Proteinmenge war in der Fettleber unverändert. Die Menge des Chemerinrezeptors CMKLR1 war in der Fettleber aber reduziert (Abbildung 42). Eine signifikant verringerte Expression des Chemerin Rezeptors in der Fettleber lässt eine geringere Aktivität von Chemerin in der Fettleber vermuten.

3.4.2 Die Proteinmenge von Chemerin ist in primären Hepatozyten höher als in Adipozyten und hepatischen Sternzellen, CMKLR1 wird in der Leber von KC, HSC und Hepatozyten produziert

Nun wurde untersucht welche Zellen in der Leber Chemerin und seinen Rezeptor CMKLR1 produzieren. RNA aus Gallengangszellen, hepatischen Sternzellen, Hepatozyten, Epithelzellen und Kupffer Zellen, die aus humaner Leber isoliert wurden, wurde verwendet um mit Hilfe einer PCR die Expression von Chemerin und CMKLR1 mRNA zu untersuchen. Die Synthese des Chemerin Proteins wurde im Lysat von Kupffer Zellen, Hepatozyten und hepatischen Sternzellen mit Western Blot analysiert. Außerdem wurde die CMKLR1 Proteinmenge von Kupffer Zellen, peripheren Blutmakrophagen, Adipozyten und primären humanen Hepatozyten miteinander verglichen. Die Chemerinkonzentration im Überstand von primären humanen Hepatozyten, hepatischen Sternzellen und primären humanen subkutanen Adipozyten wurde mit ELISA gemessen um Rückschlüsse auf die Proteinkonzentrationen in den Überständen der einzelnen Zelltypen zu erhalten.

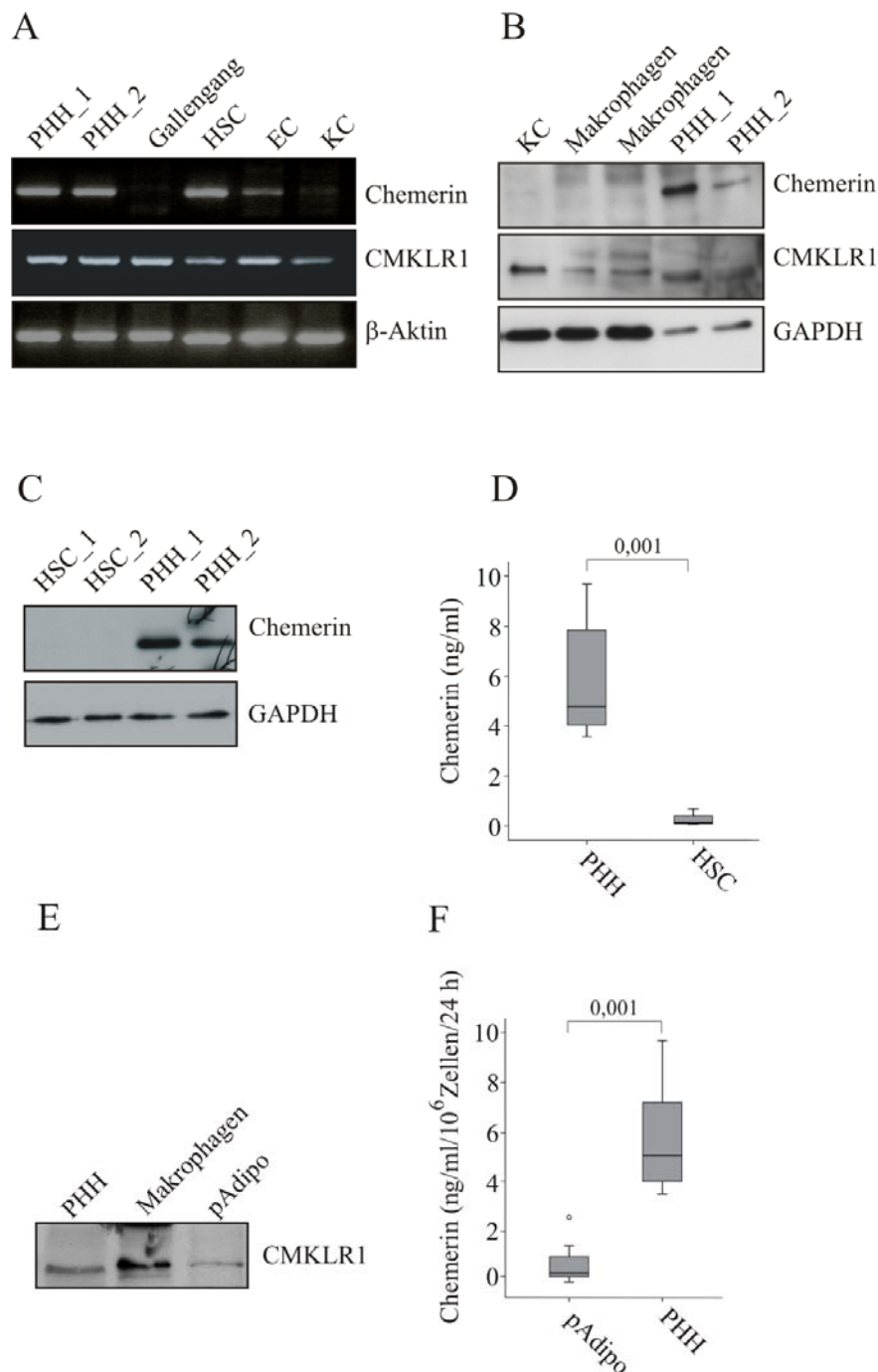


Abbildung 43: (A) Chemerin, CMKLR1 und GAPDH mRNA in PHH, Gallengangszellen, HSC, Epithelzellen der Leber (EC) und KC (B) Chemerin, CMKLR1 und GAPDH Protein in KC, Makrophagen und PHH. (C) Chemerin und GAPDH Protein im Lysat von PHH und HSC, sowie (D) Chemerin in den Überständen dieser Zellen nach 24 h Inkubation in Wachstumsmedium. (E) CMKLR1 Protein in PHH, Makrophagen und primären humanen subkutanen Adipozyten (pAdipo). (F) Chemerin in Überständen von PHH und pAdipo nach 24 h Inkubation in Wachstumsmedium.

Chemerin mRNA konnte in Hepatozyten, hepatischen Sternzellen und Epithelzellen jedoch nicht in Gallengangszellen und in Kupffer Zellen der Leber nachgewiesen werden. (Abbildung 43A). In Kupffer Zellen und in peripheren Blutmakrophagen war im Western

Blot kein Chemerin zu detektieren, während primäre Hepatozyten Chemerin Protein produzieren. Der Chemerin Rezeptor wird, wie bereits beschrieben, von Makrophagen exprimiert [47]. Auch Hepatozyten produzieren CMKLR1 Protein (Abbildung 43B). Im Zelllysate von hepatischen Sternzellen war kein Chemerin im Western Blot nachweisbar (Abbildung 43C). Mit Hilfe der sensitiveren Methode des ELISAs konnte man aber Chemerin im Überstand dieser Zellen messen. Die Konzentration war im Überstand der hepatischen Sternzellen aber viel geringer als in dem der Hepatozyten (Abbildung 43D). Die Proteinmenge von CMKLR1 war in humanen Hepatozyten höher als in primären humanen subkutanen Adipozyten (Abbildung 43E). Hepatozyten hatten auch bezogen auf die Zellzahl mehr Chemerin im Überstand (Abbildung 43F).

In der Leber sind es also hauptsächlich die Hepatozyten, die Chemerin produzieren. Die Chemerinmenge ist in diesen Zellen beim Menschen sogar höher als in den Adipozyten.

3.4.3 Einfluss von freien Fettsäuren, sowie Adipokinen und Zytokinen auf Chemerin und CMKLR1 in primären humanen Hepatozyten

3.4.3.1 Palmitin- und Ölsäure haben keinen Einfluss auf CMKLR1 und auf Chemerin im Zelllysats und Überstand

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Palmitin- und Ölsäure inkubiert und der Einfluss dieser Fettsäuren auf Chemerin und CMKLR1 untersucht.

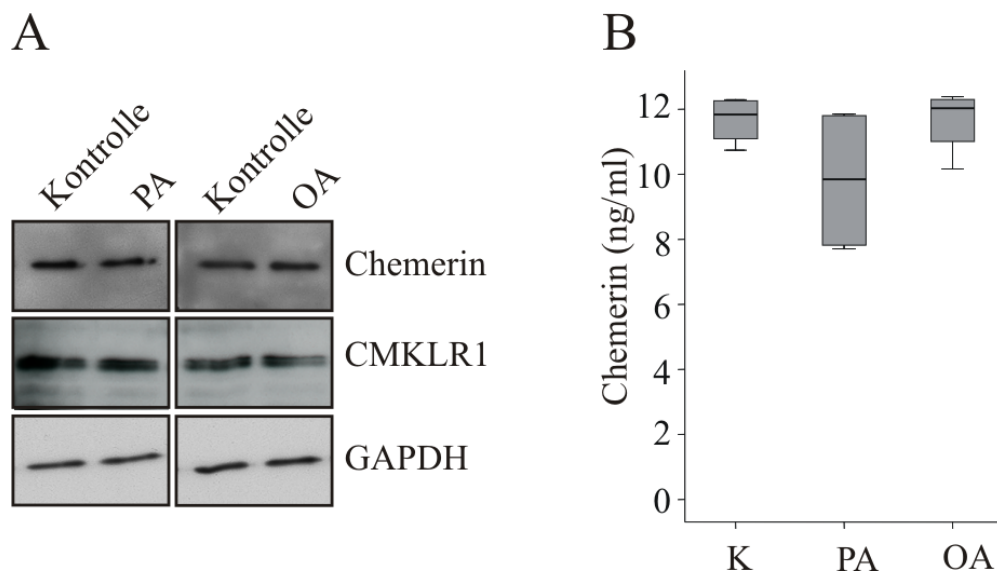


Abbildung 44: (A) Chemerin und CMKLR1 Protein in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet), die 24 h mit 0,3 mM Palmitin (PA)- oder Ölsäure (OA) inkubiert wurden. (B) Densitrometrische Auswertung der Chemerin Signale in A.

Die Inkubation mit Fettsäuren hatte keinen Einfluss auf die Chemerin und CMKLR1 Proteinmenge im Zelllysats (Abbildung 44A) und auch die Chemerinkonzentration im Überstand der Hepatozyten war nach Stimulation mit Palmitin- und Ölsäure unverändert (Abbildung 44B).

3.4.3.2 Adiponectin hat keinen Einfluss auf Chemerin im Zelllysate, induziert aber CMKLR1 auf mRNA und Proteinebene

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Adiponectin stimuliert und der Effekt dieses Adipokins auf Chemerin und CMKLR1 untersucht.

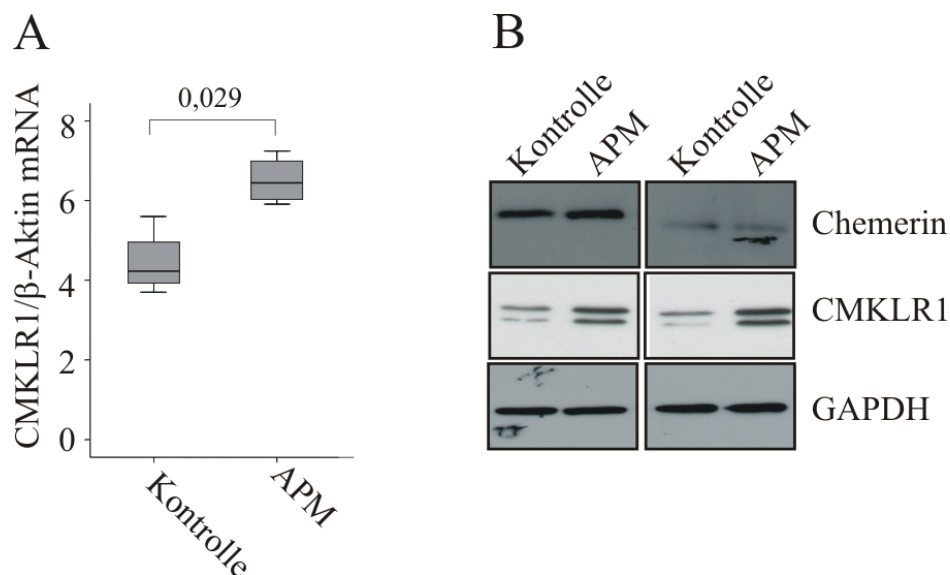


Abbildung 45: (A) CMKLR1 geteilt durch β -Aktin mRNA, sowie (B) Chemerin, CMKLR1 und GAPDH Protein in PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet), die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin stimuliert wurden.

Adiponectin induzierte die CMKLR1 mRNA (Abbildung 45A) und das CMKLR1 Protein (Abbildung 45B), hatte aber keinen Einfluss auf die Menge an Chemerin mRNA (nicht gezeigt) oder das Protein in den Zellen (Abbildung 45B).

3.4.3.3 Adiponectin, IL-6, Leptin und TGF- β regulieren Chemerin im Überstand

Leptin ist bei fettleibigen Personen im Serum erhöht [84]. Eine zunehmende Leptinresistenz fördert bei diesen Menschen jedoch die Entstehung einer Fettleber [85]. IL-6 ist im Serum von Patienten mit NAFLD erhöht und fördert die Progression der Entzündung und der Fibrose in der Leber [86]. TGF- β wird in der Leber von NASH Patienten vermehrt produziert und treibt die Fibrosierung voran (Abschnitt 1.3.2). Adiponectin ist bei fettleibigen Personen im Serum reduziert [25]. Bei Fettleber und NASH wirkt dieses Adipokin protektiv (Abschnitt 1.5.4).

Im folgenden Experiment wurde untersucht welchen Einfluss diese Faktoren, die bei der NAFLD eine wichtige Rolle spielen, auf die Chemerinkonzentration im Überstand von primären humanen Hepatozyten haben.

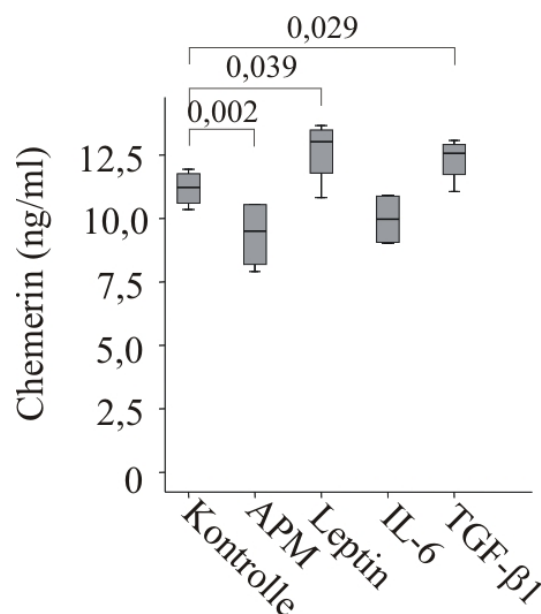


Abbildung 46: Chemerin im Überstand von PHH (Hepatozyten von 4 Spendern wurden verwendet), die 24 h mit 10 μ g/ml Adiponectin, 5 ng/ml TGF- β 1, 20 ng/ml Leptin, 20 ng/ml IL-6 oder PBS als Kontrolle inkubiert wurden.

Leptin und TGF- β , die das Fortschreiten der NAFLD fördern, erhöhten die Chemerinmenge im Überstand von primären Hepatozyten. IL-6 hatte keinen Einfluss, während dass hepatoprotektive Adiponectin die Chemerinmenge im Zellüberstand reduzierte (Abbildung 46).

3.4.3.4 Chemerin ist in der Leber von Adiponectin KO Mäusen erhöht, während CMKLR1 reduziert ist

Die Proteinmenge von Chemerin und CMKLR1 wurde in der Leber von Adiponectin-defizienten Mäusen bestimmt und mit derer in Wildtyp Mäusen verglichen. Die Lebergewebsproben wurden zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. K. Walsh von der Boston University.

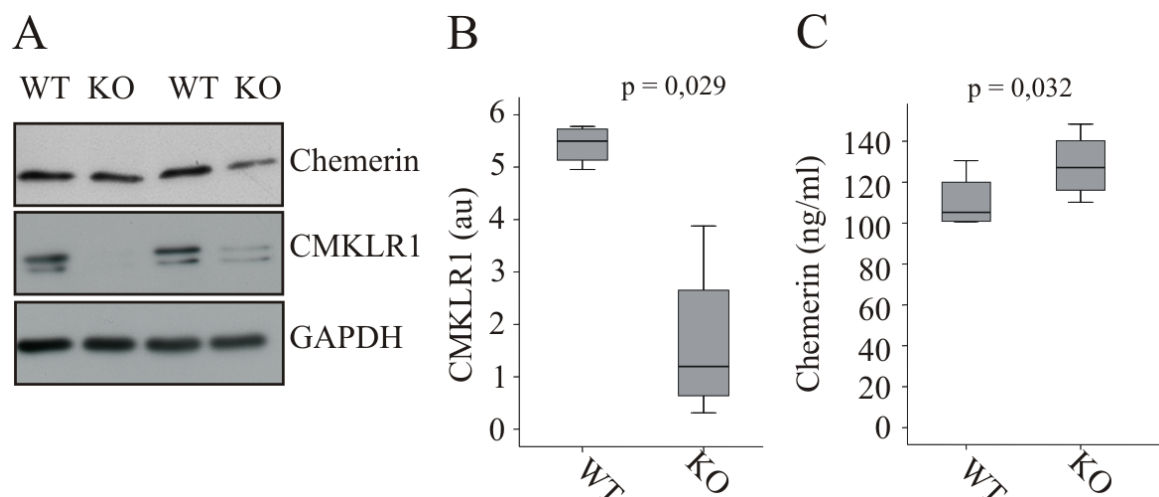


Abbildung 47: (A) Chemerin, CMKLR1 und GAPDH Protein im Lysat von C57/Bl6 Wildtyp (WT) und C57/Bl6 Adiponectin Knock out (KO) Mäusen. (B, C) Densitrometrische Auswertung der Chemerin und CMKLR1 Signale in A.

Die Chemerin Proteinmenge ist in den Lebern der Adiponectin-defizienten Mäuse höher als in den Lebern der Wildtyp Mäuse (Abbildung 47A und C). Die Menge an CMKLR1 hingegen ist in der Leber von Adiponectin-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren deutlich reduziert (Abbildung 47A und B).

3.4.4 Einfluss von Chemerin auf die Insulinwirkung in primären humanen Hepatozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Chemerin in primären Skelettmuskelzellen die Insulinwirkung inhibiert [53]. Um die Rolle von Chemerin bei der NAFLD zu erforschen wurde untersucht ob Chemerin in primären humanen Hepatozyten auch in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Insulinresistenz stehen könnte.

3.4.4.1 Die Inkubation von Hepatozyten mit rekombinantem Chemerin reduziert die Insulin vermittelte Phosphorylierung von Akt und erhöht die Glukosemenge im Überstand dieser Zellen

Primäre humane Hepatozyten wurden mit Chemerin vorinkubiert und nach Mediumwechsel mit Insulin stimuliert. Die Auswirkung der Chemerin Vorbehandlung auf die Insulin induzierte Glukosesenkung und Phosphorylierung von Akt wurde betrachtet.

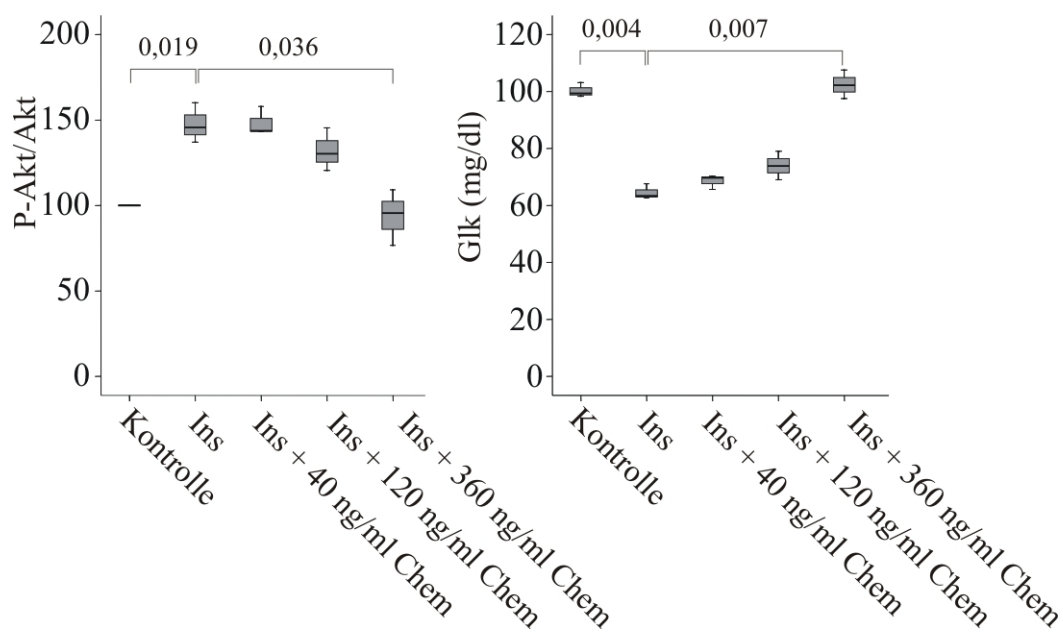


Abbildung 48: Densitometrische Quantifizierung der Phospho-Akt zu Akt Western Blot Signale und die Glukosekonzentration (Glk) im Überstand von PHH, die 24 h mit rekombinantem humanem Chemerin vorinkubiert wurden und anschließend 30 Minuten mit 200 nM Insulin stimuliert wurden. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS vorinkubiert und mit Wasser stimuliert. Es wurden PHH von drei Spendern auf diese Weise behandelt und zur Auswertung herangezogen.

Die Vorinkubation mit Chemerin führte bei einer Konzentration von 360 ng/ml zu einer signifikanten Reduktion der Phospho-Akt zu Akt Rate im Zelllysate nach Insulinstimulation

verglichen mit den Zellen, die nur mit Insulin stimuliert wurden. Die Vorinkubation mit 360 ng/ml Chemerin führte auch zu einer signifikanten Erhöhung der Glukosekonzentration im Überstand der Zellen (Abbildung 48). Das bedeutet, dass Chemerin in Hepatozyten die Insulinsignaltransduktion inhibiert und der durch Insulin induzierten Hemmung der Glukoneogenese entgegenwirkt.

3.4.4.2 Chemerin Knock down hat keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt, senkt jedoch die Synthese von CTGF

Die Chemerinproteinsynthese wurde in primären humanen Hepatozyten mit siRNA inhibiert und die Auswirkung der daraus resultierenden reduzierten Chemerinmenge auf die Insulinwirkung und die CTGF Proteinmenge in diesen Zellen untersucht.

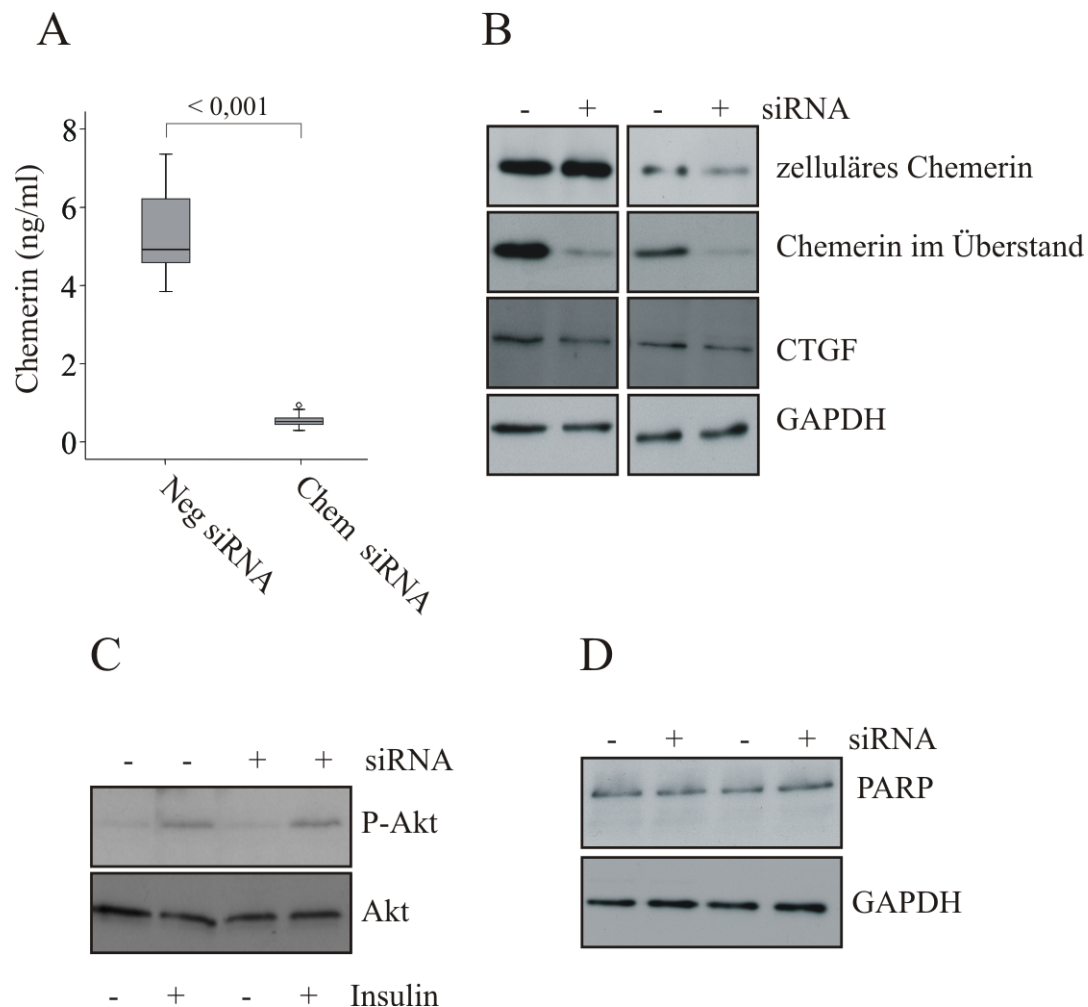


Abbildung 49: (A) Chemerin im Überstand von PHH nach 24 h Inkubation in Wachstumsmedium. Die Zellüberstände wurden 72 h nach der Transfektion mit Chemerin siRNA (Chem siRNA) oder Kontroll siRNA (Neg siRNA) geerntet. (B) Chemerin, CTGF und GAPDH im Lysat dieser Zellen, sowie Chemerin im Überstand. Nachweis mit Hilfe von Western Blot Analysen. (C) Phospho Akt und Akt Protein in PHH nach Chemerin Knock down und anschließender Stimulation mit 200 nM Insulin für 30 Minuten. (D) Full length PARP Signal in den Lysaten dieser Zellen.

Die Elektroporation der Zellen mit Chemerin siRNA führte zu einer deutlichen Reduktion von Chemerinprotein im Zelllysate und im Überstand (Abbildung 49A). Die Reduktion der Chemerinmenge ging einher mit einer Verminderung der CTGF Proteinmenge (Abbildung

49B). Die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt war dagegen durch den Chemerin Knock down nicht beeinflusst (Abbildung 49C). Der Knock down von Chemerin hatte keinen Einfluss auf die Spaltung von PARP (Abbildung 49D), das heißt, dass die Zellen durch die Inkubation mit Chemerin siRNA nicht vermehrt in Apoptose übergangen.

3.4.5 Chemerin ist im Serum von Patienten mit Fettleber reduziert

Chemerin wurde im Serum von Patienten mit und ohne Fettleber gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kontrollpersonen sich im Body Mass Index (BMI) nicht signifikant von den Fettleberpatienten unterschieden. Außerdem wurden nur Patienten zur Messung herangezogen, die geringe Mengen oder keinen Alkohol konsumierten und auch keine anderen Leberkrankheiten aufwiesen.

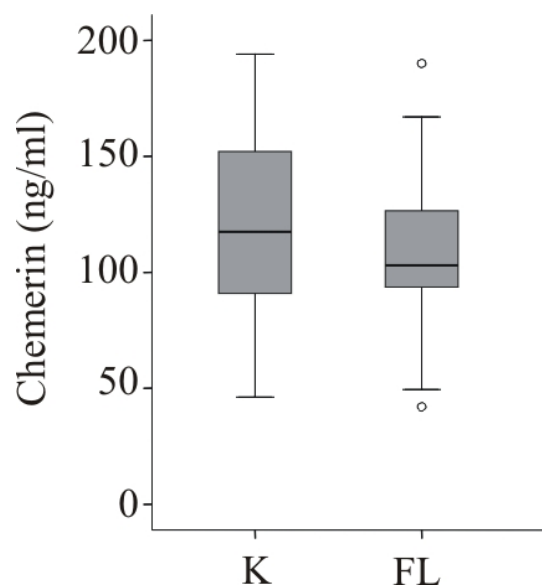


Abbildung 50: Chemerin im Serum von Patienten mit (18 Probanden) und ohne (18 Probanden) sonographisch diagnostizierter Fettleber. Zur Auswertung wurden die Patienten nach dem BMI abgeglichen.

Die Chemerinkonzentration war im Serum der Patienten mit Fettleber und nicht verfetteter Leber (Abbildung 50) gleich.

4 Diskussion

4.1 Adiponectin und seine Rezeptoren in der hepatischen Steatose

4.1.1 Adiponectinserumkonzentrationen in der NAFLD

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Adiponectinserumkonzentration beim Menschen mit viszeraler Fettleibigkeit reduziert ist und invers mit der Insulinresistenz korreliert [26, 87-88]. Hypoadiponectinämie zeigte in einer weiteren Studie eine bessere Assoziation mit dem metabolischen Syndrom als jeder andere inflammatorische Marker [89]. Außerdem konnte bereits mehrfach demonstriert werden, dass niedriges Serumadiponectin in Verbindung mit der Entwicklung von Typ 2 Diabetes mellitus steht [89-95]. Diese Studien betrachteten die Gesamtmenge aller Adiponectinisoformen. Wie in Abschnitt 1.5.2 beschrieben zirkuliert Adiponectin als LMW-, MMW- und HMW-Isoform im Serum. Untersuchungen, die die Konzentrationen der einzelnen Isoformen im Serum betrachteten ergaben, dass Insulinsensitivität und Glukosetoleranz besser mit HMW-Adiponectin als mit Gesamtadiponectin korrelieren [96].

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass in Patienten mit einer Fettleber und einer NASH der Serumadiponectinspiegel reduziert war. Dabei zeigte sich, dass die Menge an Adiponectin mit zunehmender hepatischer Fibrose abnahm. Niedriges Adiponectin bei den NASH Patienten war dabei unabhängig vom BMI und der Insulinresistenz. Diese hatten jedoch einen erhöhten Bauch- zu Hüftumfang, also eine Fettverteilung hin zu mehr viszeralem Fett. [2, 97]. In Leberzirrhosepatienten dagegen, ebenso wie in Ratten, in denen mit Gallengangsligatur eine Leberzirrhose erzeugt wurde, war der Adiponectinspiegel erhöht. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Leber am Abbau von Adiponectin beteiligt ist und die stark geschädigte Leber das Adiponectin nicht mehr effektiv entfernt [97-98]. Alternativ könnte auch die renale Exkretion von Adiponectin bei Patienten mit Lebererkrankungen reduziert sein.

In dem Patientenkollektiv, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, war die Adiponectinkonzentration im Serum der Fettleberpatienten signifikant reduziert unabhängig vom BMI der Personen (Abbildung 6). Die Mäuse bei denen durch Fütterung mit Paigendiät eine NASH induziert wurde, hatten ebenfalls signifikant niedrigere Adiponectinserumkonzentrationen (Abbildung 7). Die Synthese von Adiponectin findet sowohl bei der Maus, als auch beim Menschen ausschließlich im Fettgewebe statt. Die reduzierte Adiponectinplasmakonzentration bei den Fettleberpatienten und den Paigenmäusen

kann also entweder durch einen vermehrten Abbau dieses Adipokins in der Leber, eine erhöhte renale Exkretion oder eine reduzierte Synthese im Fettgewebe zustande kommen. Halberg et al wiesen in Hochfettdiät gefütterten Tieren und ob/ob Mäusen nach, dass der hepatische Abbau von Adiponectin vermindert ist und folgerten daraus eine extrem reduzierte adipozytäre Synthese, die letztendlich die niedrigen systemischen Spiegel erklärt [99]. Die Fettleberpatienten in dieser Studie hatten einen den Kontrollpatienten vergleichbaren BMI und auch die Fettverteilung (bestimmt durch den Bauch- zu Hüftumfang) war bei den beiden Gruppen vergleichbar. Daher ist wahrscheinlich die Adiponectinsynthese im Fettgewebe der Patienten mit Fettleber stark vermindert. Ob dies nun lediglich Folge oder auch Ursache der Leberverfettung ist kann nur mit Hilfe prospektiver Studien geklärt werden. Des Weiteren finden sich bestimmte Polymorphismen im Adiponectingen gehäuft in NAFLD Patienten und dies belegt eine Rolle dieses Adipokins für die Pathogenese dieser Erkrankung [100]. Die Mäuse, die mit Paigendiät gefüttert wurden, waren signifikant schwerer als die mit Standarddiät ernährten Tiere (Daten nicht gezeigt). Bei diesen Tieren könnte die Verringerung der Adiponectinserumkonzentration durch die reduzierte Synthese bei erhöhtem Körperfett verursacht worden sein.

4.1.2 Die Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in der hepatischen Steatose

Die Expression der Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in der Leber von Patienten mit Fettleber und NASH wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. In einem Kollektiv von 21 Patienten (7 Kontrollen, 7 Patienten mit Fettleber, 7 Patienten mit NASH) war die AdipoR2 mRNA in der Fettleber und der NASH gegenüber den Kontrollen reduziert, AdipoR1 war unverändert [101]. In einer Gruppe von 35 Personen (11 Kontrollen, 12 Patienten mit Fettleber, 12 Patienten mit NASH) war die AdipoR2 mRNA in der Leber der NASH Patienten verglichen mit den Fettleberpatienten und den Kontrollen reduziert [102]. Eine weitere Studie fand keinen Unterschied in der Proteinmenge von AdipoR2 und AdipoR1 in der Leber beim Vergleich von 18 krankhaft fettleibigen Personen mit NASH und 12 krankhaft fettleibigen Personen mit einfacher Fettleber [103].

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiven ergab sich kein Unterschied in der AdipoR1 und AdipoR2 mRNA Konzentration in der Leber von Personen mit Fettleber, NASH oder nicht verfetteter Leber (Abbildung 8). AdipoR2 Protein war jedoch in der Fettleber im Vergleich zur nicht verfetteten Leber reduziert (Abbildung 9). Die Reduktion der AdipoR2 Proteinmenge in der Fettleber ist also posttranskriptionell reguliert.

Die Fettleber steht in engem Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom. Daher sind viele Patienten mit Fettleber fettleibig und haben eine hepatische Insulinresistenz, was zu einer Hyperinsulinämie im Serum dieser Patienten führt. In der hepatischen Zelllinie THLE-5b führte die Stimulation mit Insulin und einer 2:1 Mischung aus Palmitin- und Ölsäure zu einer Reduktion der AdipoR2 mRNA [101]. Die erhöhte Insulinmenge im Serum der Patienten mit Fettleber könnte also die AdipoR2 Produktion in den Leberzellen reprimieren.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Spendern hatte die Stimulation von primären Hepatozyten mit Palmitin- und Ölsäure keinen Einfluss auf AdipoR1 und AdipoR2 mRNA und Protein (Abbildung 13 und 14). Adiponectin, das bei Fettleberpatienten reduziert ist, (Abbildung 6) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf AdipoR1 und AdipoR2 in diesen Zellen (Abbildung 13 und 14). Ob Adiponectin, Palmitin- oder Ölsäure in-vivo zur Regulation von AdipoR1 und AdipoR2 in Hepatozyten beitragen kann durch unser in-vitro System nicht entgültig geklärt werden. Für die starke Reduktion an AdipoR2 Protein, wie man sie in der Leber der steatotischen Patienten beobachten kann, sind aber wohl andere Faktoren, die in der Fettleber verändert sind, verantwortlich.

4.2 Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten und verfetteten Hepatozyten

4.2.1 Einfluss von Adiponectin auf die Activin A zu Follistatin Rate in nicht verfetteten Hepatozyten

Follistatin ist ein natürlicher Antagonist von Activin A. Ein biologischer Effekt von Activin A tritt nur auf, wenn sich das Verhältnis von Follistatin zu Activin A im extrazellulären Raum ändert [17]. Adiponectin induziert Activin A auf mRNA Ebene und im Überstand und reduziert Follistatin auf mRNA Ebene und im Überstand von primären humanen Hepatozyten (Abbildung 15 und 16). Bei der Berechnung der Activin A zu Follistatin Rate wurde das Molekulargewicht, die Dimerisierung von Activin A und die benötigte Bindung von zwei Molekülen Follistatin an ein Activin A Molekül um dies zu blockieren, berücksichtigt [104]. Die Stimulation mit Adiponectin führt zu einer signifikanten Zunahme der Activin A zu Follistatin Rate im Zellüberstand der primären Hepatozyten (Abbildung 16). Adiponectin induziert Activin A auch im Überstand von primären humanen peripheren Blutmonozyten, die selbst kein Follistatin freisetzen [105]. Möglicherweise induziert Adiponectin Activin A auch in Kupffer Zellen und trägt so zu einer weiteren Erhöhung der Activin A zu Follistatin Rate in der Leber bei. Es wurde bereits publiziert, dass eine Erhöhung der Activin A zu Follistatin Rate in HSCs von Ratten zu einer verstärkten Produktion von extrazellulären Matrixproteinen führt und dadurch die hepatische Fibrose im Bereich der HSCs gefördert wird [17]. Activin A kann aber auch die Fettsäuresynthese in der Leber reduzieren und die β -Oxidation erhöhen, was zu einer Reduktion der Triglyzeridmenge führt [18, 106]. Die Follistatin/Activin A Rate betrug nach der Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Adiponectin $3,5 \pm 0,7$. Das bedeutet, dass Follistatin nach wie vor im Überschuss vorhanden ist und nach einer bestimmten Zeit das sezernierte Activin A durch Follistatin gebunden wird. Durch die Adiponectin induzierte Senkung der Follistatin/Activin A Rate wird die diffusionsbedingte Wahrscheinlichkeit aber gesenkt, dass ein Activin A Dimer auf Follistatin trifft bevor es einen Activin Rezeptor erreicht. Die Stimulation mit Adiponectin führt also zu einer Steigerung der Zeitspanne in der Activin A nach der Sekretion frei und damit aktiv vorliegt und somit erhöht sich die Konzentration an Activin A Molekülen, die ihre Wirkung entfalten können. Durch den Überschuss an Follistatin und die dadurch bedingte Inaktivierung jedes sezernierten Activin A Dimers ist anzunehmen, dass sich die Activin A Wirkung auf die eigene Zelle und eng angrenzende Nachbarzellen beschränkt.

4.2.2 Activin A ist im Überstand von hepatozytären Zelllinien geringer und Follistatin höher als im Überstand von primären humanen Hepatozyten

Die hepatozytären Zelllinien HepG2, Hep3B, PLC, HUH7 und NeHepLxHT sezernieren im basalen Zustand deutlich weniger Activin A als primäre Hepatozyten. Die Menge an freigesetztem Follistatin ist in HepG2, PLC, HUH7 und NeHepLxHT stark erhöht (Abbildung 17). Die basale Follistatin zu Activin A Rate ist also in den Zelllinien höher als in den primären Hepatozyten. Es wurde bereits gezeigt, dass Activin A die Lebermasse durch Inhibierung der DNA Synthese und Induktion der Apoptose in Hepatozyten reguliert [17, 107], während eine Follistatin Infusion beispielsweise die Proliferation und Regeneration von Hepatozyten nach partieller Hepatektomie in Ratten fördert [17]. Einhergehend mit diesen Ergebnissen wurde eine Reduktion der Activin A zu Follistatin Rate bereits in Lebertumoren von Menschen und Ratten beschrieben [107-108]. Demgegenüber wurde aber auch gezeigt, dass Activin A die VEGF (vascular endothelial growth factor) Expression in humanen Hepatomzelllinien erhöht, wodurch man dem Protein in dieser Hinsicht eine proangiogenetische und damit fördernde Wirkung bei der Tumorgenese zuschreiben könnte [107]. Da Adiponectin in primären humanen Hepatozyten die Activin A zu Follistatin Rate erhöht, könnte dies eine Inhibierung der Proliferation bewirken und somit der Entstehung von Lebertumoren entgegenwirken. In den hepatozytären Zelllinien ist Adiponectin nicht mehr in der Lage Activin A zu induzieren und Follistatin wird nur in der Zelllinie NeHepLxHT durch Adiponectin reduziert (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Einfluss von Adiponectin auf Activin A in verfetteten Hepatozyten

In einer Studie wurde eine erhöhte Activin A zu Follistatin mRNA Rate in der humanen Fettleber beschrieben [18]. Da Activin A von Makrophagen freigesetzt wird und für diese Zellen eine starke Erhöhung der Activin A Synthese durch proinflammatorische Zytokine bzw. Lipopolysaccharid bekannt ist, wäre dies eine mögliche Erklärung. In primären humanen Hepatozyten haben weder Palmitin- noch Ölsäure einen Einfluss auf Activin A und Follistatin im Überstand (Abbildung 19). Die Verfettung von primären Hepatozyten mit Palmitin- und Ölsäure verhindert sogar die Adiponectin-induzierte Erhöhung von Activin A im Überstand dieser Zellen (Abbildung 19). Dies lässt eine verminderte Adiponectinwirkung zumindest in Bezug auf die Erhöhung von Activin A in der Fettleber vermuten. Palmitin- und Ölsäure haben keinen Einfluss auf die Adiponectin vermittelte Reduktion von Follistatin im Überstand

der Hepatozyten (Abbildung 19). Das bedeutet, dass Follistatin und Activin A unabhängig voneinander durch Adiponectin reguliert werden.

4.2.4 Zellulärer Mechanismus der Inhibierung der Adiponectinwirkung auf Activin A in verfetteten Hepatozyten

Adiponectin induziert in primären humanen Hepatozyten die Translokation von NF- κ B p65 in den Zellkern. Somit führt eine Stimulation mit Adiponectin zu einer Aktivierung von NF- κ B. Die Verfettung dieser Zellen mit Palmitin- und Ölsäure verhinderte die durch Adiponectin ausgelöste Aktivierung von NF- κ B (Abbildung 22). Die Inhibierung von NF- κ B führte zwar zu einer basalen Reduktion von Activin A im Überstand der Zellen, verhinderte aber nicht die Induktion durch Adiponectin (Abbildung 23). NF- κ B ist also an der basalen Regulation von Activin A in Hepatozyten beteiligt. Für die durch Adiponectin vermittelte Erhöhung ist es nicht von Bedeutung.

Die Vorinkubation von Hepatozyten mit TGF- β blockiert ebenfalls die Induktion von Activin A durch Adiponectin (Abbildung 21). Durch Blockierung des TGF- β Rezeptors I (Alk5) mit dem Inhibitor SB431542 oder von SMAD3 mit dem Inhibitor SIS3 konnte der inhibitorische Effekt von TGF- β auf die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A aufgehoben werden (Abbildung 24A). TGF- β unterdrückt den Adiponectineffekt also über eine Aktivierung von Alk5 und SMAD3.

Palmitin- und Ölsäure induzieren TGF- β im Überstand der primären Hepatozyten (Abbildung 20). Es wäre also denkbar, dass die Inhibierung der Adiponectin vermittelten Induktion von Activin A durch die Fettsäuren durch eine Erhöhung von TGF- β im Überstand hervorgerufen wird. Dieses könnte dann auto- und parakrin über die Aktivierung des Alk5-SMAD Signalwegs die Induktion von Activin A durch Adiponectin verhindern. Diese Theorie wurde bestätigt, die Blockierung von Alk5 und SMAD3 konnte auch den inhibitorischen Effekt von Palmitinsäure auf die Adiponectin vermittelte Induktion von Activin A aufheben (Abbildung 25B).

4.2.5 Die Activin A und Follistatin Serumkonzentrationen sind in Patienten mit Fettleber unverändert

Eine Studie beschrieb eine Erhöhung von systemischem Activin A und eine stärkere Erhöhung von Follistatin im Serum von Patienten mit Fettleber, was eine Reduktion der Activin A zu Follistatin Rate bedeutete. Dies steht im Gegensatz zu einer Erhöhung der Activin A zu Follistatin Rate in der Leber bei diesen Patienten und zeigt, dass systemische und hepatische Spiegel nicht synchron reguliert werden [18]. In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv war Activin A und Follistatin im Serum von Patienten mit und ohne Fettleber in gleicher Konzentration zu finden (Abbildung 26). In der obigen Studie [18] war der BMI bei den steatotischen Patienten erhöht, während in dieser Arbeit die beiden Gruppen nach vergleichbarem BMI eingeteilt wurden. Die Expression von Activin A ist im Fettgewebe von übergewichtigen Personen erhöht und ist positiv mit dem Gewicht in Patienten mit polyzystrischem Ovarialsyndrom assoziiert, es gibt bisher jedoch keine Studien, die eine Erhöhung von Activin A im Serum bei übergewichtigen Personen nachweisen [105, 109-110].

4.3 Einfluss von Adiponectin auf die TGF- β Wirkung in der Leber

4.3.1 Der TGF- β Pseudorezeptor BAMBI ist in der Fettleber reduziert während CTGF nicht verändert ist

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass CTGF in der fibrotischen und zirrhotischen Leber von Patienten aber auch Mäusen und Ratten erhöht ist [22]. Eine Überexpression von CTGF führt zu einer verstärkten Fibrose in der Tetrachlorkohlenstoff- und Gallengangsligatur- induzierten Leberschädigung bei Mäusen [111]. CTGF verstärkt die TGF- β Wirkung durch Festigung der Bindung von TGF- β an dessen Rezeptor und Inhibierung der Bindung des TGF- β Antagonisten BMP-7 an dessen Rezeptor [22]. In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv war die CTGF Proteinmenge in der Leber von Patienten mit und ohne Fettleber vergleichbar (Abbildung 27). Es wurde bereits postuliert, dass die Expression von CTGF in aktiv fibrosierendem Gewebe induziert ist und das TGF- β ein starker Induktor von CTGF ist [22]. Es wäre daher denkbar, dass CTGF bei Patienten mit NAFLD beim Übergang von der Fettleber zur NASH im Zuge der erhöhten TGF- β Aktivität induziert wird und dann das Fortschreiten der Leberschädigung vorantreibt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der TGF- β Pseudorezeptor BAMBI in der Leber von steatotischen Patienten reduziert ist (Abbildung 27). In Mäusen, die mit Paigendiät gefüttert wurden und die daraufhin eine Fettleber mit einer Entzündung und einer milden Fibrose entwickeln [112] und in Mäusen, die mit einer MCD Diät gefüttert wurden, die zu einer starken Leberfibrose führt [113], war die BAMBI Proteinmenge ebenfalls vermindert (Abbildung 29). Es ist anzunehmen, dass die Reduktion von BAMBI die durch TGF- β geförderte Progression der NAFLD unterstützt. Hepatisches BAMBI korrelierte in den humanen Patienten negativ mit dem BMI (Abbildung 28). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von BAMBI in der Leber durch Adipokine oder Zytokine reguliert wird, deren hepatische und/oder systemische Spiegel mit dem BMI assoziiert sind.

4.3.2 Hepatozyten und hepatische Sternzellen synthetisieren unterschiedliche Isoformen von BAMBI Protein

Seki et al konnten in einer Studie an Mäusen keine BAMBI Expression in Kupffer Zellen und Hepatozyten nachweisen und postulierten, dass nur in den hepatischen Sternzellen BAMBI mRNA und Protein synthetisiert wird [21]. In dieser Arbeit konnte in Kupffer Zellen, die aus humanem Lebergewebe isoliert wurden, ebenfalls keine BAMBI mRNA bzw. das Protein nachgewiesen werden (Abbildung 30A). Es konnte aber nachgewiesen werden, dass BAMBI mRNA (Abbildung 33A) und BAMBI Protein in primären humanen Hepatozyten gebildet wird (Abbildung 30A und B). Die humanen Hepatozyten wiesen sogar eine wesentlich höhere BAMBI Proteinmenge auf als die humanen hepatischen Sternzellen (Abbildung 30C). Die Western Blot Analyse zeigte auch, dass Hepatozyten ein 38 kDa großes BAMBI Protein produzieren, während BAMBI in hepatischen Sternzellen nur 35 kDa schwer ist (Abbildung 30B). Das aufgrund der mRNA Größe erwartete Molekulargewicht von BAMBI liegt bei 26 kDa [114]. Das bedeutet, dass BAMBI sowohl in Hepatozyten als auch in hepatischen Sternzellen posttranslational modifiziert wird und dass diese Modifikationen in den beiden Zelltypen voneinander abweichen. Das BAMBI Protein in den Leberlysaten entspricht der Größe nach dem von Hepatozyten produzierten Protein.

Eine erhöhte Expression von BAMBI mRNA wurde bereits in verschiedenen Typen von Tumoren gezeigt und es wurde postuliert, dass das Protein die Tumorgenese durch Inhibierung der antiproliferativen Eigenschaften von TGF- β fördert [115-116]. Demgegenüber wurde in dieser Arbeit eine stark reduzierte BAMBI Proteinmenge in den hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Hep3B im Vergleich zu primären Hepatozyten beobachtet, obwohl die BAMBI mRNA Menge in den Zelllinien leicht erhöht war (Abbildung 31).

4.3.3 BAMBI inhibiert die TGF- β Wirkung in Hepatozyten

In hepatischen Sternzellen konnte bereits gezeigt werden, dass BAMBI die TGF- β induzierte Kollagenproduktion inhibieren kann [21]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass BAMBI in den Hepatozyten von Fettleberpatienten und Mäusen mit NASH und Fibrose reduziert ist (Abbildung 27 und 29). Deshalb wurde der Einfluss von BAMBI auf die TGF- β Wirkung in Hepatozyten untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression von BAMBI die TGF- β vermittelte Induktion von CTGF in Hepatozyten verringern konnte (Abbildung 32).

BAMBI wirkt also auch in Hepatozyten dem profibrogenen TGF- β entgegen und die Reduktion von BAMBI in den Hepatozyten bei steatotischen Patienten könnte somit das Fortschreiten der durch TGF- β hervorgerufenen Leberschädigung fördern. Die Rolle von BAMBI muss jedoch in weiteren Studien geklärt werden, da BAMBI in den verfetteten Lebern verringert war aber nur ein kleiner Teil dieser Patienten eine Leberfibrose entwickeln wird.

4.3.4 Adiponectin induziert BAMBI und reprimiert CTGF

Adiponectin induzierte BAMBI in primären humanen Hepatozyten (Abbildung 33) und in humanen hepatischen Sternzellen (Abbildung 34). Es zeigte sich, dass an der Induktion durch Adiponectin sowohl die Aktivierung der AMPK als auch von NF- κ B beteiligt waren (Abbildung 35). Der reduzierte Adiponectinspiegel bei Patienten mit Fettleber (Abbildung 6) könnte sekundär zur Verminderung von BAMBI in der Leber von steatotischen Patienten beitragen. Adiponectin reprimierte zudem CTGF in Hepatozyten (Abbildung 36) über eine Aktivierung von PPAR- α (Abbildung 37). CTGF wird eine Rolle an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix im Zuge der Leberfibrose zugeschrieben [22] und Adiponectin wirkt somit diesem Prozess entgegen. Adiponectin konnte auch der TGF- β induzierten Erhöhung von CTGF in Hepatozyten entgegenwirken (Abbildung 38A). Die Erhöhung von BAMBI durch Adiponectin ist in Gegenwart von TGF- β nicht gestört. Die Reduktion des TGF- β Aktivators CTGF und die Induktion des TGF- β Inhibitors BAMBI durch Adiponectin verringert somit die Wirkung des profibrogenen Zytokins TGF- β in der Leber. Adiponectin wirkt somit also wohl der TGF- β induzierten Aktivierung von hepatischen Sternzellen, sowie der Induktion der Apoptose [19] und der epithelialen mesenchymalen Transition in Hepatozyten entgegen [19-20].

4.3.5 Adiponectin wirkt der TGF- β induzierten SMAD2 und SMAD3 Phosphorylierung entgegen

TGF- β bindet an Heterodimere der Ser/Thr Kinase Rezeptoren TGFR I und II, die dann SMAD2 und 3 phosphorylieren und somit aktivieren. Diese bilden dann mit SMAD4 einen aktiven Transkriptionsfaktor, der in den Kern wandert (Abbildung 2). Die Vorinkubation mit Adiponectin führte in primären humanen Hepatozyten zu einer signifikanten Reduktion der TGF- β induzierten Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 (Abbildung 38). Es konnte

bereits gezeigt werden, dass das Diabetesmedikament Metformin die SMAD3 Phosphorylierung in Herzfibroblasten von Mäusen inhibieren kann [117]. Metformin und Adiponectin induzieren BAMBI in primären Hepatozyten (Abbildung 33 und 35), wodurch eine inhibitorische Wirkung der beiden Stoffe auf die TGF- β induzierte SMAD Phosphorylierung erklärt werden könnte. Der PPAR- α Agonist WY14643 konnte die Intensität der Phosphorylierung von SMAD2 und 3 ausgelöst durch TGF- β ebenfalls verringern (Abbildung 39). Adiponectin ist auch in der Lage PPAR α zu aktivieren [118] und daher kann man annehmen, dass der inhibitorische Effekt von Adiponectin auf SMAD2 und 3 auch über die Aktivierung von PPAR- α vermittelt wird.

4.3.6 Adiponectin erhöht die MMP-9 Aktivität im Überstand von primären humanen Hepatozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in der durch Tetrachlorkohlenstoff und Gallengangsligatur induzierten Leberfibrose in Ratten die Expression von MMPs, darunter auch MMP-9, erhöht ist. Dabei wirken die MMPs fibrolytisch [24, 119]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Spendern zeigte sich in der Leber von Patienten mit Leberfibrose eine erhöhte MMP-9 Aktivität, während steatotische Patienten die gleiche MMP-9 Aktivität aufwiesen wie Personen mit nicht verfetteter Leber (Abbildung 40). Es ist also anzunehmen, dass die hepatische MMP-9 Aktivität durch Signalmoleküle erhöht wird, die beim Übergang von der Fettleber zur Fibrose induziert werden. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass TGF- β ein starker Induktor von MMP-2 und MMP-9 in Brustepithelzellen ist [120]. In primären humanen Hepatozyten konnte TGF- β die MMP-9 Aktivität im Überstand der Zellen jedoch nicht induzieren (Daten nicht gezeigt). Adiponectin dagegen erhöhte die mRNA Expression und auch die Aktivität von MMP-9 (Abbildung 41). Adiponectin könnte also durch die Induktion der MMP-9 den Abbau der extrazellulären Matrix in der fibrotischen Leber fördern und damit der Progression der Leberfibrose entgegen wirken. Der Adiponectinserumspiegel ist allerdings bei Patienten mit NASH reduziert [2, 97], daher ist anzunehmen, dass bestimmte Zytokine oder Adipokine, die bei Patienten mit Leberfibrose erhöht sind, wie zum Beispiel TGF- β , MMP-9 induzieren und den reduzierten induktiven Effekt von Adiponectin auf MMP-9 bei der Leberfibrose überdecken.

4.4 Einfluss von Adiponectin auf Chemerin und CMKLR1 in der Leber

4.4.1 CMKLR1 jedoch nicht Chemerin ist in der humanen Fettleber vermindert

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit histologisch gesicherter Fettleber ohne Entzündung bzw. Fibrose hatten in der Leber eine signifikant reduzierte Menge an CMKLR1 verglichen mit den Patienten ohne Leberverfettung. Chemerin dagegen war in der Leber der Fettleberpatienten und der Patienten ohne Leberverfettung in vergleichbarer Menge vorhanden (Abbildung 42). Die reduzierte Menge an CMKLR1 spricht für eine verringerte Chemerinwirkung in der Fettleber.

4.4.2 Chemerin wird in der Leber hauptsächlich von den Hepatozyten synthetisiert

Chemerin mRNA war in der menschlichen Leber in isolierten Hepatozyten, hepatischen Sternzellen und Epithelzellen nachweisbar, nicht jedoch in Gallengangszellen und Kupffer Zellen. Alle Leberzellen exprimierten dagegen CMKLR1 (Abbildung 43A und B). Die Chemerinproteinmenge in der Leber wird von den Hepatozyten bestimmt. Im Überstand der hepatischen Sternzellen konnte zwar Chemerin nachgewiesen werden, die Menge im Überstand der Hepatozyten war jedoch um etwa das 20-fache höher (Abbildung 43D). Die von den Hepatozyten freigesetzte Menge war auch um circa 5 bis 10-fach höher als in primären humanen Adipozyten (Abbildung 43F). Dies lässt vermuten, dass die hepatische Chemerinsynthese den Chemerinspiegel entscheidend beeinflussen kann. Diese These wird noch dadurch unterstützt, dass die Chemerinkonzentration in der Pfortader und im Serum in etwa gleich ist [121]. Ähnliche Konzentrationen in der Pfortader und im systemischen Kreislauf schliessen eine präferentielle Synthese von Chemerin im viszeralen Fett aus. Adipokine, die dort gebildet werden gelangen über die Pfortader zunächst in die Leber und diese kann erhebliche Mengen dieser Proteine extrahieren, wodurch sich im Serum eine niedrigere Konzentration ergibt als in der Pfortader. Chemerin dient als Lockstoff für Leukozyten [47]. Durch die Freisetzung von Chemerin könnten die Hepatozyten also möglicherweise die Anlockung von Immunzellen in die Leber fördern und somit eine Rolle bei Entzündungsreaktionen einnehmen. In der frühen Emryonalentwicklung produzieren beispielsweise Darmepithelzellen Chemerin um Makrophagen zu rekrutieren [122]. Da alle Leberzellen CMKLR1 produzieren ist auch anzunehmen, dass die hepatische Chemerinsekretion auch auto- und parakrine Wirkungen zur Folge hat.

4.4.3 Chemerin wird in primären humanen Hepatozyten durch Adiponectin, Leptin und TGF- β reguliert

Adiponectin erniedrigt Chemerin, wohingegen Leptin und TGF- β Chemerin im Überstand von primären humanen Hepatozyten erhöhen. IL-6, Palmitin- und Ölsäure zeigten keinen Effekt (Abbildung 44 und 46). Adiponectin hatte dagegen keinen Einfluss auf zelluläres Chemerin, erhöhte aber die Expression von CMKLR1 auf mRNA und Proteinebene (Abbildung 45). In Übereinstimmung mit diesen in-vitro Daten war in der Leber der Adiponectin-defizienten Mäuse die Menge an CMKLR1 Protein reduziert, während Chemerin unverändert war (Abbildung 47). Da TGF- β und Leptin, die das Fortschreiten der NAFLD fördern [4, 19] Chemerin induzieren und das hepatoprotektive Adiponectin [2, 44-45] Chemerin reduziert könnte man vermuten, dass Chemerin bei der NAFLD eher zur Leberschädigung beiträgt. Adiponectin induziert aber den Chemerin Rezeptor CMKLR1 auf Hepatozyten, woraus man schließen könnte, dass dieses Adipokin einerseits durch Senkung der Chemerinfreisetzung aus Hepatozyten die Wirkung von Chemerin auf andere Zellen in der Leber verringert, andererseits aber durch Induktion des Rezeptors die Chemerinwirkung auf die Hepatozyten nicht reduziert oder sogar erhöht ist. Da CMKLR1 auch als Rezeptor für kurze Chemerinfragmente, die die Wirkung von Chemerin aufheben können, und als Rezeptor für Resolvine mit einer protektiven Wirkung in der NAFLD fungiert, könnte die Erhöhung von CMKLR1 durch Adiponectin auch vor Leberschädigung schützen.

4.4.4 Chemerin reduziert die Insulinwirkung in primären humanen Hepatozyten

Die Stimulation von primären humanen Hepatozyten mit Insulin hemmt die Glukoneogenese und steigert die Glukoseaufnahme in diesen Zellen [123]. Dies führt zu einer Reduktion der Glukosekonzentration im Überstand der Hepatozyten. Eines der wichtigsten Signalmoleküle bei der Insulinsignaltransduktion ist Akt, das durch Phosphorylierung aktiviert wird. Eine Vorinkubation von primären Hepatozyten mit 360 ng/ml Chemerin, einer Menge, die im Serum bei adipösen Personen gemessen wurde [48, 121, 124], konnte die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt und die Senkung der Glukosemenge im Überstand dieser Zellen vollständig verhindern (Abbildung 48). Chemerin bewirkt also eine hepatische Insulinresistenz. Adiponectin reprimiert Chemerin in Hepatozyten (Abbildung 46) und könnte damit die Insulinsensitivität in der Leber erhöhen.

Chemerin Knock down in primären Hepatozyten führte zwar zu einer deutlichen Reduktion von Chemerin Protein im Lysat und Überstand der Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf die

Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt (Abbildung 49C). Die Menge von Chemerin im Überstand der in-vitro Kultur ist mit 8 bis 12 ng/ml im Vergleich zur Serumkonzentration (bis zu 400 ng/ml) und damit wohl auch im Vergleich zur Konzentration, die in-vivo in der Leber auf die Hepatozyten einwirkt, sehr gering. Es wäre daher denkbar, dass Chemerin in dieser geringen Konzentration die Insulinwirkung nicht beeinflusst und eine weiter reduzierte Chemerinkonzentration, wie sie durch den Knock down zustande kommt, auch weiterhin zu keinem sichtbaren Effekt auf die Insulinwirkung führt.

Der Chemerin Knock down senkt jedoch basal die Menge des profibrogenen Proteins CTGF in den Hepatozyten (Abbildung 49B). Bei GeneChip Analysen (durchgeführt vom KFB, Biopark Regensburg) hatte eine Stimulation mit Chemerin keine Auswirkung auf die Expression von CTGF in diesen Zellen (nicht gezeigt), daher ist anzunehmen, dass die Reduktion von CTGF durch die verminderte Menge an intrazellulärem Chemerin zustande kommt. Die Induktion von CTGF durch intrazelluläres Chemerin könnte profibrogen wirken.

4.4.5 Chemerin ist im Serum von Fettleberpatienten nicht verändert

Chemerin ist im Serum von übergewichtigen Spendern erhöht [48, 121]. Es zeigt eine positive Korrelation mit der Fastenglukose, dem Fasteninsulin, den Plasmatriglyzeriden und Leptin und eine negative Korrelation mit dem BMI und HDL Cholesterin [121, 125]. Die Chemerinkonzentration war im Serum von Patienten mit Fettleber ähnlich der Menge im Serum von Patienten ohne Leberverfettung (Abbildung 50). In der Fettleber selbst synthetisieren die Hepatozyten ähnlich viel zelluläres Chemerin Protein wie in der nicht verfetteten Leber (Abbildung 42).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von Adiponectin in der Leber bei der Entstehung und Progression der NASH zu untersuchen. Dabei wurde der Effekt von Adiponectin auf Activin A und Follistatin in verfetteten und nicht verfetteten Hepatozyten untersucht und der Einfluss dieses Adipokins auf die Wirkung von TGF- β in der Leber genauer betrachtet. Außerdem wurde die Rolle von Chemerin bei der NAFLD untersucht und der Einfluss von Adiponectin auf die Expression dieses Proteins und seines Rezeptors CMKLR1 in Hepatozyten bestimmt.

Die Adiponectinserumkonzentration war in steatotischen Patienten und Mäusen mit Diät-induzierter NASH und Fibrose verringert. Zudem war die hepatische Proteinmenge von AdipoR2 in der Fettleber geringer. Daher ist anzunehmen, dass die Adiponectinwirkung in der NAFLD reduziert ist.

Adiponectin induziert Activin A und reduziert dessen Inhibitor Follistatin in nicht verfetteten Hepatozyten in einer in-vitro Kultur von primären humanen Hepatozyten. Die Verfettung von Hepatozyten mit Palmitinsäure verhindert den induktiven Effekt von Adiponectin auf Activin A. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesem Prozess die Palmitinsäure TGF- β im Überstand der Zellen erhöht und dieses dann über einen Alk5 und SMAD3 abhängigen Signalweg den Adiponectineffekt auf Activin A inhibiert.

In weiteren in-vitro Stimulationsversuchen zeigte sich, dass Adiponectin in primären humanen Hepatozyten über Aktivierung der AMPK und NF- κ B und in hepatischen Sternzellen den TGF- β Pseudorezeptor BAMBI induziert. In Hepatozyten hatte die Überexpression von BAMBI eine Reduktion der TGF- β induzierten CTGF Proteinmenge zur Folge. Zudem führte die Stimulation von primären Hepatozyten mit Adiponectin für sich bereits über eine Aktivierung von PPAR- α zu einer Reduktion dieses TGF- β Aktivators. Adiponectin konnte auch die TGF- β induzierte Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 in Hepatozyten verringern. Dieser Effekt wurde auch durch Aktivierung von PPAR- α mit dem Agonisten WY14643 erreicht, woraus man schließen kann dass dieses intrazelluläre Signalmolekül auch bei der Adiponectinwirkung eine entscheidende Rolle spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass Chemerin beim Menschen in relativ großer Menge von den Hepatozyten produziert wird. In-vitro inhibiert dieses Protein in diesen Zellen die Insulinwirkung. Adiponectin vermindert zwar die Freisetzung von Chemerin aus den Hepatozyten, erhöhte aber die Menge des Rezeptors CMKLR1 auf diesen Zellen. Adiponectin könnte somit die Wirkung von Chemerin aber auch weiterer CMKLR1 Liganden wie Resolvin erhöhen.

6 Publikationen

1. **Wanninger J**, Bauer S, Neumeier M, Eisinger K, Scherer M, Farkas S, Wiest R, Schäffler A, Buechler C: Portal levels of latent transforming growth factor-beta are related to liver function in patients with liver cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, im Druck.
2. **Wanninger J**, Neumeier M, Hellerbrand C, Schacherer D, Bauer S, Weiss TS, Huber H, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Lipid accumulation impairs adiponectin-mediated induction of activin A by increasing TGFbeta in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2010, im Druck.
3. **Wanninger J**, Neumeier M, Weigert J, Bauer S, Weiss TS, Schäffler A, Krempl C, Bleyl C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-kappaB, and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Sep;297(3):G611-8.
4. **Wanninger J**, Neumeier M, Weigert J, Liebisch G, Weiss TS, Schäffler A, Aslanidis C, Schmitz G, Schölmerich J, Buechler C: Metformin reduces cellular lysophosphatidylcholine and thereby may lower apolipoprotein B secretion in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1781(6-7):321-5.
5. Bauer S, **Wanninger J**, Schmidhofer S, Weigert J, Neumeier M, Dorn C, Hellerbrand C, Zimara N, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP2) Activation after Excess Triglyceride Storage Induces Chemerin in Hypertrophic Adipocytes. *Endocrinology*. 2010, im Druck
6. Bauer S, **Wanninger J**, Neumeier M, Wurm S, Weigert J, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Elevated free fatty acids and impaired adiponectin bioactivity contribute to reduced SOD2 protein in monocytes of type 2 diabetes patients. *Exp Mol Pathol*. 2010 Oct 28.
7. Wiest R, Weigert J, **Wanninger J**, Neumeier M, Bauer S, Schmidhofer S, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine*. 2010, im Druck
8. Bauer S, Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Schäffler A, Luchner A, Schnitzbauer AA, Aslanidis C, Buechler C: Low-abundant adiponectin receptors in visceral adipose tissue of humans and rats are further reduced in diabetic animals. *Arch Med Res*. 2010;41(2):75-82.

-
9. Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Bauer S, Farkas S, Scherer MN, Schnitzbauer A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1404-11.
 10. Weber M, Sporrer D, Weigert J, **Wanninger J**, Neumeier M, Wurm S, Stögbauer F, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes. *FEBS Lett.* 2009 19;583(22):3718-24.
 11. Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, **Wanninger J**, Filarsky M, Bauer S, Aslanidis C, Rogler G, Ott C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 16(4):630-7.
 12. Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72(3):342-8.
 13. Sporrer D, Weber M, **Wanninger J**, Weigert J, Neumeier M, Stögbauer F, Lieberer E, Bala M, Kopp A, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest.* 2009 ;39(8):671-9.
 14. Stögbauer F, Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Sporrer D, Weber M, Schäffler A, Enrich C, Wood P, Grewal T, Aslanidis C, Buechler C: Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro. *Exp Mol Med.* 2009 31;41(7):501-7.
 15. Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Schober F, Sporrer D, Weber M, Schramm A, Wurm S, Stögbauer F, Filarsky M, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes. *Cytokine.* 2009 ;45(2):86-91.
 16. Wurm S, Neumeier M, Weigert J, **Wanninger J**, Gerl M, Gindner A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: 15. Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway. *Cytokine.* 2008 ;44(1):185-90.
 17. Stögbauer F, Neumeier M, Weigert J, **Wanninger J**, Grandl M, Lehle K, Schmitz G, Aslanidis C, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C: Highly efficient and low-cost method to isolate human blood monocytes with high purity. *J Immunol Methods.* 2008 20;337(1):78-80.

18. Weigert J, Neumeier M, **Wanninger J**, Wurm S, Kopp A, Schober F, Filarsky M, Schäffler A, Zeitoun M, Aslanidis C, Buechler C: Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes. *FEBS Lett.* 2008 28;582(12):1777-82.
19. Schober F, Neumeier M, Weigert J, Wurm S, **Wanninger J**, Schäffler A, Dada A, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Buechler C: Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 5;361(4):968-73.
20. Neumeier M, Weigert J, Buettner R, **Wanninger J**, Schäffler A, Müller AM, Killian S, Sauerbruch S, Schlachetzki F, Steinbrecher A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E965-9.

Reviews:

1. Buechler C, **Wanninger J**, Neumeier M: Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett.* 2010 Oct 22;584(20):4280-6.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Betreuung dieser Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Christa Büchler für die großartige Betreuung, die vielen ausführlichen Diskussionen, für die umfassende Hilfestellung bei diversen Problemen, das Beisteuern vieler Ideen zu dieser Arbeit, das Korrekturlesen, das Erstellen des Zweitgutachtens und für Vieles mehr.

Bei Herrn Prof. Dr. Richard Warth bedanke ich mich für die Bereitschaft die Aufgabe des dritten Prüfers im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm bedanke ich mich für die Bereitschaft den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Markus, Sabrina, Johanna, Tanja, Yvonne, Andrea, Sandra, Fabian, Franziska, Kristina, Roland, Carina, Kerstin, Thomas, Iris, Christl, Daniela und Markus für die Hilfe im Labor und die schöne Zeit bedanken.

Meinen Eltern und meiner Schwester Liseth möchte ich für ihre ständige und uneingeschränkte Unterstützung während meiner Arbeit besonders danken.

Die Arbeit wurde finanziert durch die Regensburger Forschungsförderung (ReForM C) und zum Teil durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU 1141/3-2).

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, den 27.12.2010

Josef Wanninger

7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Vanni, E. Bugianesi, A. Kotronen, S. De Minicis, H. Yki-Jarvinen, and G. Svegliati-Baroni, From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa?, *Dig Liver Dis* 42 (2010) 320-330.
- [2] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 273-280.
- [3] M. Gil-Campos, R. R. Canete, and A. Gil, Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity, *Clin Nutr* 23 (2004) 963-974.
- [4] C. Z. Larter, S. Chitturi, D. Heydet, and G. C. Farrell, A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers, *J Gastroenterol Hepatol* 25 (2010) 672-690.
- [5] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372 (1994) 425-432.
- [6] L. A. Tartaglia, M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe, and R. I. Tepper, Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R, *Cell* 83 (1995) 1263-1271.
- [7] D. Preiss, and N. Sattar, Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations, *Clin Sci (Lond)* 115 (2008) 141-150.
- [8] G. Baffy, Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view, *J Hepatol* 51 (2009) 212-223.
- [9] E. Hijona, L. Hijona, J. I. Arenas, and L. Bujanda, Inflammatory mediators of hepatic steatosis, *Mediators Inflamm* 2010 (2010) 837419.
- [10] R. S. Rector, J. P. Thyfault, G. M. Uptergrove, E. M. Morris, S. P. Naples, S. J. Borengasser, C. R. Mikus, M. J. Laye, M. H. Laughlin, F. W. Booth, and J. A. Ibdah, Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model, *J Hepatol* 52 (2010) 727-736.
- [11] O. A. Gressner, M. S. Rizk, E. Kovalenko, R. Weiskirchen, and A. M. Gressner, Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go?, *J Gastroenterol Hepatol* 23 (2008) 1024-1035.
- [12] B. Q. Starley, C. J. Calcagno, and S. A. Harrison, Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection, *Hepatology* 51 (2010) 1820-1832.
- [13] A. Herpin, C. Lelong, and P. Favrel, Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans, *Dev Comp Immunol* 28 (2004) 461-485.
- [14] R. K. Assoian, A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller, and M. B. Sporn, Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J Biol Chem* 258 (1983) 7155-7160.
- [15] A. Deli, E. Kreidl, S. Santifaller, B. Trotter, K. Seir, W. Berger, R. Schulte-Hermann, C. Rodgarkia-Dara, and M. Grusch, Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol* 14 (2008) 1699-1709.
- [16] O. A. Gressner, B. Lahme, M. Siluschek, K. Rehbein, R. Weiskirchen, and A. M. Gressner, Intracrine signalling of activin A in hepatocytes upregulates connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression, *Liver Int* 28 (2008) 1207-1216.

-
- [17] S. Patella, D. J. Phillips, J. Tchongue, D. M. de Kretser, and W. Sievert, Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 (2006) G137-144.
- [18] A. Yndestad, J. W. Haukeland, T. B. Dahl, K. Bjoro, I. P. Gladhaug, C. Berge, J. K. Damas, T. Haaland, E. M. Loberg, P. Linnestad, K. Birkeland, Z. Konopski, B. Halvorsen, R. K. Berge, and P. Aukrust, A complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease, *Am J Gastroenterol* 104 (2009) 2196-2205.
- [19] S. Dooley, H. Weng, and P. R. Mertens, Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma, *Dig Dis* 27 (2009) 93-101.
- [20] T. Kojima, K. Takano, T. Yamamoto, M. Murata, S. Son, M. Imamura, H. Yamaguchi, M. Osanai, H. Chiba, T. Himi, and N. Sawada, Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes, *Liver Int* 28 (2008) 534-545.
- [21] E. Seki, S. De Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner, and R. F. Schwabe, TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis, *Nat Med* 13 (2007) 1324-1332.
- [22] O. A. Gressner, and A. M. Gressner, Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases, *Liver Int* 28 (2008) 1065-1079.
- [23] F. D'Amico, M. Consolo, A. Amoroso, E. Skarmoutsou, B. Mauceri, F. Stivala, G. Malaponte, G. Bertino, S. Neri, and M. C. Mazzarino, Liver immunolocalization and plasma levels of MMP-9 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatitis C infection, *Acta Histochem* 112 (2010) 474-481.
- [24] Y. P. Han, Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis, *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3 (2006) S88-91.
- [25] M. Iwaki, M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima, and I. Shimomura, Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors, *Diabetes* 52 (2003) 1655-1663.
- [26] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 79-83.
- [27] K. Maeda, K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara, cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1), *Biochem Biophys Res Commun* 221 (1996) 286-289.
- [28] Y. Nakano, T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma, *J Biochem (Tokyo)* 120 (1996) 803-812.
- [29] L. Shapiro, and P. E. Scherer, The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor, *Curr Biol* 8 (1998) 335-338.
- [30] Y. Nakano, T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma, *J Biochem* 120 (1996) 803-812.
- [31] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, G. Wehrwein, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, C. Wrede, and C. Buechler, Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells, *J Leukoc Biol* 79 (2006) 803-808.

- [32] J. P. Whitehead, A. A. Richards, I. J. Hickman, G. A. Macdonald, and J. B. Prins, Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome, *Diabetes Obes Metab* 8 (2006) 264-280.
- [33] T. Kadowaki, and T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors, *Endocr Rev* 26 (2005) 439-451.
- [34] J. R. Sowers, Endocrine functions of adipose tissue: focus on adiponectin, *Clin Cornerstone* 9 (2008) 32-38; discussion 39-40.
- [35] H. Waki, T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J Biol Chem* 278 (2003) 40352-40363.
- [36] T. S. Tsao, E. Tomas, H. E. Murrey, C. Hug, D. H. Lee, N. B. Ruderman, J. E. Heuser, and H. F. Lodish, Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways, *J Biol Chem* 278 (2003) 50810-50817.
- [37] S. E. Hosch, J. M. Olefsky, and J. J. Kim, APPLIED mechanics: uncovering how adiponectin modulates insulin action, *Cell Metab* 4 (2006) 5-6.
- [38] C. Buechler, ed. 2006.
- [39] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. Weiss, S. Kirchner, S. Laberer, J. Scholmerich, and C. Buechler, Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors, *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2005) 924-929.
- [40] M. Fasshauer, J. Klein, S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, and R. Paschke, Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes, *FEBS Lett* 558 (2004) 27-32.
- [41] G. Chinetti, C. Zawadzki, J. C. Fruchart, and B. Staels, Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR, *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 151-158.
- [42] I. Kharroubi, J. Rasschaert, D. L. Eizirik, and M. Cnop, Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells, *Biochem Biophys Res Commun* 312 (2003) 1118-1122.
- [43] A. Xu, Y. Wang, H. Keshaw, L. Y. Xu, K. S. Lam, and G. J. Cooper, The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice, *J Clin Invest* 112 (2003) 91-100.
- [44] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med* 8 (2002) 1288-1295.
- [45] T. P. Combs, A. H. Berg, S. Obici, P. E. Scherer, and L. Rossetti, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, *J Clin Invest* 108 (2001) 1875-1881.
- [46] Y. Kamada, T. Takehara, and N. Hayashi, Adipocytokines and liver disease, *J Gastroenterol* 43 (2008) 811-822.
- [47] X. Y. Du, and L. L. Leung, Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41 (2009) 973-979.
- [48] K. Bozaoglu, K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder, and D. Segal, Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome, *Endocrinology* 148 (2007) 4687-4694.
- [49] K. B. Goralski, T. C. McCarthy, E. A. Hanniman, B. A. Zabel, E. C. Butcher, S. D. Parlee, S. Muruganandan, and C. J. Sinal, Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism, *J Biol Chem* 282 (2007) 28175-28188.

- [50] S. G. Roh, S. H. Song, K. C. Choi, K. Katoh, V. Wittamer, M. Parmentier, and S. Sasaki, Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 362 (2007) 1013-1018.
- [51] J. Kaur, R. Adya, B. K. Tan, J. Chen, and H. S. Randeva, Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun* 391 (2010) 1762-1768.
- [52] S. Kralisch, S. Weise, G. Sommer, J. Lipfert, U. Lossner, M. Bluher, M. Stumvoll, and M. Fasshauer, Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro, *Regul Pept* 154 (2009) 102-106.
- [53] H. Sell, J. Laurencikienė, A. Taube, K. Eckardt, A. Cramer, A. Horrigs, P. Arner, and J. Eckel, Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells, *Diabetes* 58 (2009) 2731-2740.
- [54] M. C. Ernst, M. Issa, K. B. Goralski, and C. J. Sinal, Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes, *Endocrinology* 151 (2010) 1998-2007.
- [55] W. Holland, T. Morrison, Y. Chang, N. Wiernsperger, and B. J. Stith, Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase, *Biochem Pharmacol* 67 (2004) 2081-2091.
- [56] B. Viollet, M. Foretz, B. Guigas, S. Horman, R. Dentin, L. Bertrand, L. Hue, and F. Andreelli, Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders, *J Physiol* 574 (2006) 41-53.
- [57] P. Libby, and J. Plutzky, Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists, *Am J Cardiol* 99 (2007) 27B-40B.
- [58] C. K. Argo, P. Loria, S. H. Caldwell, and A. Lonardo, Statins in liver disease: a molehill, an iceberg, or neither?, *Hepatology* 48 (2008) 662-669.
- [59] R. Ali, and K. Cusi, New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Ann Med* 41 (2009) 265-278.
- [60] M. Duvnjak, V. Tomasic, M. Gomercic, L. Smircic Duvnjak, N. Barsic, and I. Lerotic, Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status, *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 7 (2009) 57-66.
- [61] L. Sobrevals, C. Rodriguez, J. L. Romero-Trejejo, G. Gondi, I. Monreal, A. Paneda, N. Juanarena, S. Arcelus, N. Razquin, L. Guembe, G. Gonzalez-Aseguinolaza, J. Prieto, and P. Fortes, Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats, *Hepatology* 51 (2010) 912-921.
- [62] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [63] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* 24 (1992) 145-149.
- [64] H. C. Birnboim, A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, *Methods Enzymol* 100 (1983) 243-255.
- [65] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- [66] M. W. Bradbury, Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 (2006) G194-198.
- [67] D. B. Jump, Fatty acid regulation of gene transcription, *Crit Rev Clin Lab Sci* 41 (2004) 41-78.
- [68] J. Wanninger, M. Neumeier, C. Hellerbrand, D. Schacherer, S. Bauer, T. S. Weiss, H. Huber, A. Schaffler, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Lipid accumulation

impairs adiponectin-mediated induction of activin A by increasing TGFbeta in primary human hepatocytes, *Biochim Biophys Acta* (2010).

[69] C. S. Katsanos, Lipid-induced insulin resistance in the liver: role of exercise, *Sports Med* 34 (2004) 955-965.

[70] S. Asamizu, M. Urakaze, C. Kobashi, M. Ishiki, A. K. Norel Din, S. Fujisaka, Y. Kanatani, A. Bukahari, S. Senda, H. Suzuki, Y. Yamazaki, M. Iwata, I. Usui, K. Yamazaki, H. Ogawa, M. Kobayashi, and K. Tobe, Angiotensin II enhances the increase in monocyte chemoattractant protein-1 production induced by tumor necrosis factor- α from 3T3-L1 preadipocytes, *J Endocrinol* 202 (2009) 199-205.

[71] Z. Zhong, Z. Wen, and J. E. Darnell, Jr., Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6, *Science* 264 (1994) 95-98.

[72] T. Hou, B. C. Tieu, S. Ray, A. Recinos Iii, R. Cui, R. G. Tilton, and A. R. Brasier, Roles of IL-6-gp130 Signaling in Vascular Inflammation, *Curr Cardiol Rev* 4 (2008) 179-192.

[73] M. C. Freitas, Y. Uchida, D. Zhao, B. Ke, R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski, Blockade of Janus kinase-2 signaling ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion, *Liver Transpl* 16 (2010) 600-610.

[74] J. Wanninger, M. Neumeier, J. Weigert, S. Bauer, T. S. Weiss, A. Schaffler, C. Kreml, C. Bleyl, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-kappaB, and STAT3 signaling pathways, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297 (2009) G611-618.

[75] M. Jinnin, H. Ihn, and K. Tamaki, Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression, *Mol Pharmacol* 69 (2006) 597-607.

[76] G. J. Inman, F. J. Nicolas, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping, and C. S. Hill, SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7, *Mol Pharmacol* 62 (2002) 65-74.

[77] T. Kadowaki, T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe, Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J Clin Invest* 116 (2006) 1784-1792.

[78] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J Clin Invest* 108 (2001) 1167-1174.

[79] D. Schenkein, Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies, *Clin Lymphoma* 3 (2002) 49-55.

[80] D. R. Alessi, A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel, PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo, *J Biol Chem* 270 (1995) 27489-27494.

[81] T. Teruel, J. C. Clapham, and S. A. Smith, PPARalpha activation by Wy 14643 induces transactivation of the rat UCP-1 promoter without increasing UCP-1 mRNA levels and attenuates PPARgamma-mediated increases in UCP-1 mRNA levels induced by rosiglitazone in fetal rat brown adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999) 311-315.

[82] K. P. Briski, Stimulatory vs. inhibitory effects of acute stress on plasma LH: differential effects of pretreatment with dexamethasone or the steroid receptor antagonist, RU 486, *Pharmacol Biochem Behav* 55 (1996) 19-26.

- [83] S. Nagpal, S. Patel, H. Jacobe, D. DiSepio, C. Ghosn, M. Malhotra, M. Teng, M. Duvic, and R. A. Chandraratna, Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin, *J Invest Dermatol* 109 (1997) 91-95.
- [84] A. E. Meinders, A. C. Toornvliet, and H. Pijl, Leptin, *Neth J Med* 49 (1996) 247-252.
- [85] C. Procaccini, M. Galgani, V. De Rosa, F. Carbone, C. La Rocca, G. Ranucci, R. Iorio, and G. Matarese, Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD, *Curr Pharm Des* 16 (2010) 1902-1912.
- [86] A. J. Patrick-Melin, M. I. Kalinski, K. R. Kelly, J. M. Haus, T. P. Solomon, and J. P. Kirwan, Nonalcoholic fatty liver disease: biochemical and therapeutic considerations, *Ukr Biokhim Zh* 81 (2009) 16-25.
- [87] M. Ryo, T. Nakamura, S. Kihara, M. Kumada, S. Shibazaki, M. Takahashi, M. Nagai, Y. Matsuzawa, and T. Funahashi, Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome, *Circ J* 68 (2004) 975-981.
- [88] T. Yatagai, S. Nagasaka, A. Taniguchi, M. Fukushima, T. Nakamura, A. Kuroe, Y. Nakai, and S. Ishibashi, Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus, *Metabolism* 52 (2003) 1274-1278.
- [89] K. Matsushita, H. Yatsuya, K. Tamakoshi, K. Wada, R. Otsuka, S. Takefuji, K. Sugiura, T. Kondo, T. Murohara, and H. Toyoshima, Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 871-876.
- [90] R. S. Lindsay, T. Funahashi, R. L. Hanson, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, P. A. Tataranni, W. C. Knowler, and J. Krakoff, Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population, *Lancet* 360 (2002) 57-58.
- [91] M. Daimon, T. Oizumi, T. Saitoh, W. Kameda, A. Hirata, H. Yamaguchi, H. Ohnuma, M. Igarashi, M. Tominaga, and T. Kato, Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study, *Diabetes Care* 26 (2003) 2015-2020.
- [92] C. Snehalatha, B. Mukesh, M. Simon, V. Viswanathan, S. M. Haffner, and A. Ramachandran, Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian indians, *Diabetes Care* 26 (2003) 3226-3229.
- [93] J. Spranger, A. Kroke, M. Mohlig, M. M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, and A. F. Pfeiffer, Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus, *Lancet* 361 (2003) 226-228.
- [94] B. B. Duncan, M. I. Schmidt, J. S. Pankow, H. Bang, D. Couper, C. M. Ballantyne, R. C. Hoogeveen, and G. Heiss, Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study, *Diabetes* 53 (2004) 2473-2478.
- [95] J. Krakoff, T. Funahashi, C. D. Stehouwer, C. G. Schalkwijk, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, S. Kobes, P. A. Tataranni, R. L. Hanson, W. C. Knowler, and R. S. Lindsay, Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian, *Diabetes Care* 26 (2003) 1745-1751.
- [96] M. Lafontan, and N. Viguerie, Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin, *Curr Opin Pharmacol* 6 (2006) 580-585.
- [97] M. Neumeier, J. Weigert, R. Buettner, J. Wanninger, A. Schaffler, A. M. Muller, S. Killian, S. Sauerbruch, F. Schlachetzki, A. Steinbrecher, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (2007) E965-969.
- [98] M. Neumeier, C. Hellerbrand, E. Gabele, R. Buettner, C. Bollheimer, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, M. Lichtenauer, J. Scholmerich, and C. Buechler, Adiponectin and its

- receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis, *World J Gastroenterol* 12 (2006) 5490-5494.
- [99] N. Halberg, T. D. Schraw, Z. V. Wang, J. Y. Kim, J. Yi, M. P. Hamilton, K. Luby-Phelps, and P. E. Scherer, Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin, *Diabetes* 58 (2009) 1961-1970.
- [100] G. Musso, R. Gambino, F. De Michieli, M. Durazzo, G. Pagano, and M. Cassader, Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH, *Hepatology* 47 (2008) 1167-1177.
- [101] A. Shimizu, T. Takamura, N. Matsuzawa, S. Nakamura, S. Nabemoto, Y. Takeshita, H. Misu, S. Kurita, M. Sakurai, M. Yokoyama, Y. Zen, M. Sasaki, Y. Nakanuma, and S. Kaneko, Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line, *Metabolism* 56 (2007) 1478-1485.
- [102] R. Vuppalanchi, S. Marri, D. Kolwankar, R. V. Considine, and N. Chalasani, Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study, *J Clin Gastroenterol* 39 (2005) 237-242.
- [103] H. Ma, V. Gomez, L. Lu, X. Yang, X. Wu, and S. Y. Xiao, Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease, *J Gastroenterol Hepatol* 24 (2009) 233-237.
- [104] N. A. Cataldo, J. Rabinovici, V. Y. Fujimoto, and R. B. Jaffe, Follistatin antagonizes the effects of activin-A on steroidogenesis in human luteinizing granulosa cells, *J Clin Endocrinol Metab* 79 (1994) 272-277.
- [105] J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, F. Schober, D. Sporrer, M. Weber, A. Schramm, S. Wurm, F. Stogbauer, M. Filarsky, A. Schaffler, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes, *Cytokine* 45 (2009) 86-91.
- [106] A. M. Gressner, and R. Weiskirchen, Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets, *J Cell Mol Med* 10 (2006) 76-99.
- [107] C. Rodgarkia-Dara, S. Vejda, N. Erlach, A. Losert, W. Bursch, W. Berger, R. Schulte-Hermann, and M. Grusch, The activin axis in liver biology and disease, *Mutat Res* 613 (2006) 123-137.
- [108] M. Grusch, C. Drucker, B. Peter-Vorosmarty, N. Erlach, A. Lackner, A. Losert, D. Macheiner, W. J. Schneider, M. Hermann, N. P. Groome, W. Parzefall, W. Berger, B. Grasl-Kraupp, and R. Schulte-Hermann, Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis, *J Hepatol* 45 (2006) 673-680.
- [109] T. Eldar-Geva, I. M. Spitz, N. P. Groome, E. J. Margalioth, and R. Homburg, Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome, *Hum Reprod* 16 (2001) 2552-2556.
- [110] T. A. Zografos, C. Liaskos, E. I. Rigopoulou, E. Togousidis, K. Makaritsis, A. Germanis, and G. N. Dalekos, Adiponectin: a new independent predictor of liver steatosis and response to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C, *Am J Gastroenterol* 103 (2008) 605-614.
- [111] Z. Tong, R. Chen, D. S. Alt, S. Kemper, B. Perbal, and D. R. Brigstock, Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes, *Hepatology* 50 (2009) 939-947.
- [112] C. Dorn, M. O. Riener, G. Kirovski, M. Saugspier, K. Steib, T. S. Weiss, E. Gabele, G. Kristiansen, A. Hartmann, and C. Hellerbrand, Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease, *Int J Clin Exp Pathol* 3 (2010) 505-514.
- [113] J. M. Schattenberg, and P. R. Galle, Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man, *Dig Dis* 28 (2010) 247-254.

- [114] C. Knight, D. Simmons, T. T. Gu, J. Gluhak-Heinrich, D. Pavlin, M. Zeichner-David, and M. MacDougall, Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse Nma/BAMBI during odontogenesis, *J Dent Res* 80 (2001) 1895-1902.
- [115] D. Pils, M. Wittinger, M. Petz, A. Gugerell, W. Gregor, A. Alfanz, R. Horvat, E. I. Braicu, J. Sehouli, R. Zeillinger, W. Mikulits, and M. Krainer, BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment, *Gynecol Oncol* 117 (2010) 189-197.
- [116] J. Fritzmann, M. Morkel, D. Besser, J. Budczies, F. Kosel, F. H. Brembeck, U. Stein, I. Fichtner, P. M. Schlag, and W. Birchmeier, A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential, *Gastroenterology* 137 (2009) 165-175.
- [117] H. Xiao, X. Ma, W. Feng, Y. Fu, Z. Lu, M. Xu, Q. Shen, Y. Zhu, and Y. Zhang, Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway, *Cardiovasc Res* 87 (2010) 504-513.
- [118] C. Q. Rogers, J. M. Ajmo, and M. You, Adiponectin and alcoholic fatty liver disease, *IUBMB Life* 60 (2008) 790-797.
- [119] P. F. Hu, H. Chen, W. Zhong, Y. Lin, X. Zhang, Y. X. Chen, and W. F. Xie, Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PAI-1 mRNA ameliorates hepatic fibrosis in rats, *J Hepatol* 51 (2009) 102-113.
- [120] E. Wiercinska, H. P. Naber, E. Pardali, G. van der Pluijm, H. van Dam, and P. Ten Dijke, The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system, *Breast Cancer Res Treat* (2010).
- [121] J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, M. Filarsky, S. Bauer, R. Wiest, S. Farkas, M. N. Scherer, A. Schaffler, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes, *Clin Endocrinol (Oxf)* 72 (2010) 342-348.
- [122] A. Maheshwari, A. R. Kurundkar, S. S. Shaik, D. R. Kelly, Y. Hartman, W. Zhang, R. Dimmitt, S. Saeed, D. A. Randolph, C. Aprahamian, G. Datta, and R. K. Ohls, Epithelial cells in fetal intestine produce chemerin to recruit macrophages, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297 (2009) G1-G10.
- [123] I. A. Leclercq, A. Da Silva Morais, B. Schroyen, N. Van Hul, and A. Geerts, Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences, *J Hepatol* 47 (2007) 142-156.
- [124] J. Weigert, F. Obermeier, M. Neumeier, J. Wanninger, M. Filarsky, S. Bauer, C. Aslanidis, G. Rogler, C. Ott, A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buechler, Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis* 16 (2010) 630-637.
- [125] M. C. Ernst, and C. J. Sinal, Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity, *Trends Endocrinol Metab* 21 (2010) 660-667.